

**WELLINGTON CESAR GALLICE**

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE VINHOS E  
QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS E TRANS-RESVERATROL UTILIZANDO  
TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS MULTIVARIADAS**

**Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-  
Graduação em Química do Setor de Ciências Exatas da  
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientadores: Prof. Dr. Patricio Peralta Zamora**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Iara Messerschmidt**

**CURITIBA**

**2010**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Paraná, por viabilizar minha formação intelectual.

Ao Departamento de Química, por proporcionar a realização deste curso.

Ao Professor Dr. Patrício Guilherme Peralta Zamora e à Professora Dra. Iara Messerschmidt, pela orientação, oportunidade e ensinamentos.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná.

Ao Professor Dr. Alfredo Ricardo Marques de Oliveira e ao Professor Dr. Gilberto Abate pela ajuda com o HPLC.

À Professora Dra. Maria Aparecida Ferreira César-Oliveira pela ajuda com os processos de extração.

Ao Técnico Ângelo pelo auxílio com o FT-IR e ao Técnico Ivono pela amizade e empréstimo de vidrarias.

À minha esposa Juliana Tracz Pereira, pela paciência, incentivo e ajuda que foram essenciais para realização desse trabalho.

À minha família, (meu pai Latimori, minha mãe Neusa e meu irmão Juliano) pelo incentivo e apoio durante todos os momentos da minha vida.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Processos e Projetos Ambientais (LabppAm)

Aos amigos e colegas do Grupo de Desenvolvimento de Técnicas Avançadas para Tratamento de Resíduos (Tecnotrater).

Aos colegas do Laboratório de Química Ambiental e de Materiais (LabQAM)

Aos amigos e colegas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia pela ajuda e incentivo.

Às Vinícolas Miolo, Garibaldi e Campo Largo e à Distribuidora de bebidas Boulevard pela gentil doação de amostras

A todas as pessoas que de maneira direta ou indireta contribuíram para minha formação e para que esse trabalho se concretizasse.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	2
2.1. HISTÓRICO DO VINHO.....	2
2.2. PRODUÇÃO DE VINHO.....	4
2.3. ESTRESSE OXIDATIVO E PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DO VINHO.....	7
<b>2.3.1. Compostos Fenólicos</b> .....	11
<b>2.3.1.1. Antocianinas</b> .....	13
<b>2.3.1.2. t-Resveratrol</b> .....	15
<b>2.3.1.2.1. Efeito Quimioprotetor do t-Resveratrol</b> .....	17
2.4. METODOLOGIAS ORIENTADAS À ANÁLISE DE VINHO.....	18
<b>2.4.1. Índice de Cor (cor e tonalidade)</b> .....	18
<b>2.4.2. Espécies Fenólicas e Capacidade Antioxidante</b> .....	18
<b>2.4.3. t-Resveratrol</b> .....	20
2.5. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR).....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	22
3.1. OBJETIVO GERAL.....	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
4.1. AMOSTRAS.....	23
4.2. REAGENTES.....	23
4.3. EQUIPAMENTOS.....	23
4.4. METODOLOGIAS.....	25

<b>4.4.1. Determinação de Fenóis Totais</b> .....	25
<b>4.4.2. Determinação da Atividade Antioxidante</b> .....	26
<b>4.4.3. Determinação de t-Resveratrol por HPLC</b> .....	28
<b>4.4.4. Caracterização por Espectroscopia UV-Vis</b> .....	27
<b>4.4.5. Caracterização por Espectrometria na Região do Infravermelho Médio</b> .....	28
<b>4.4.6. Estudos Quimiométricos</b> .....	28
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
5.1. INTENSIDADE DE COR (IC) E TONALIDADE (T).....	30
<b>5.1.1. Análise de Componentes Principais (PCA)</b> .....	33
5.2. DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS.....	35
<b>5.2.1. Modelagem Multivariada de Polifenóis Totais</b> .....	39
5.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE t-RESVERATROL.....	41
5.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	45
<b>5.4.1. Modelagem Multivariada da Atividade Antioxidante</b> .....	50
5.5. CARACTERIZAÇÃO DE VINHOS POR ESPECTROMETRIA FTIR-ATR.....	55
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	58
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	59

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS PRINCIPAIS ETAPAS DA PRODUÇÃO DE VINHO TINTO (1. COLHEITA DAS UVAS, 2. ESMAGAMENTO, 3. ADIÇÃO DE SULFITO, 4. ADIÇÃO DE FERMENTO, 5. FERMENTAÇÃO, 6. PRENSAGEM, 7. CLARIFICAÇÃO, 8. FILTRAÇÃO, 9. ENVELHECIMENTO, 10. ENGARRAFAMENTO).....	6
<b>FIGURA 2.</b> ESQUEMA REPRESENTATIVO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES RADICAIS DURANTE O PROCESSO METABÓLICO MITOCONDRIAL (FONTE: FEILLET- COUDRAY <i>ET AL.</i> , 2009).....	10
<b>FIGURA 3.</b> PRODUÇÃO DE t-RESVERATROL E OUTROS ESTILBENOS EM PLANTAS EXPOSTAS À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA EM COMPARAÇÃO COM PLANTAS INFECTADAS POR FUNGOS (FONTE: ZHANG & BJÖRN, 2009).....	15
<b>FIGURA 4.</b> REPRESENTAÇÃO DA BIOSÍNTESE DO t-RESVERATROL (ZHANG & BJÖRN, 2009).....	16
<b>FIGURA 5.</b> ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROCEDIMENTO UTILIZADO NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS.....	25
<b>FIGURA 6.</b> ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL ABST. <sup>+</sup> POR UM ANTIOXIDANTE E SUA FORMAÇÃO PELO PERSULFATO DE POTÁSSIO.....	26
<b>FIGURA 7.</b> ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROCEDIMENTO UTILIZADO NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE t-RESVERATROL.....	27
<b>FIGURA 8.</b> ACESSÓRIO PARA MEDIDAS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA.....	28
<b>FIGURA 9.</b> REGIÕES DO ESPECTRO VISÍVEL RELACIONADAS À ABSORÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E SEUS DERIVADOS RESPONSÁVEIS PELA COR EM VINHOS TINTOS.....	30
<b>FIGURA 10.</b> ESPECTROS ELETRÔNICOS (400-800 nm) DAS AMOSTRAS DE VINHO ANALISADAS.....	32

<b>FIGURA 11.</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS VALORES DE ÍNDICE DE COR ( $IC = Ab. 420\text{ nm} + Ab. 520\text{ nm} + Ab. 620\text{ nm}$ ) E DE TONALIDADE ( $T = Ab. 420\text{ nm}/Ab. 520\text{ nm}$ ) NAS AMOSTRAS DE VINHO ANALISADAS.....	32
<b>FIGURA 12.</b> GRÁFICO DE PESOS DAS CINCO PRIMEIRAS COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) NA ANÁLISE DE DADOS DE ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA.....	34
<b>FIGURA 13.</b> GRÁFICO DE SCORES DAS DUAS PRIMEIRAS COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) NA ANÁLISE DE DADOS DE ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA.....	34
<b>FIGURA 14.</b> GRÁFICO DE SCORES (PC2 E PC3) NA ANÁLISE DE DADOS DE ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA.....	35
<b>FIGURA 15.</b> CURVA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU.....	36
<b>FIGURA 16.</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS ( $\text{g L}^{-1}$ ) NAS 47 AMOSTRAS DE VINHO TINTO.....	38
<b>FIGURA 17.</b> GRÁFICO DE RESÍDUOS DE “STUDENT” <i>versus</i> “LEVERAGE” PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 4 VARIÁVEIS LATENTES E DADOS CENTRADOS NA MÉDIA.....	40
<b>FIGURA 18.</b> CURVA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO TEOR DE t-RESVERATROL. ....	41
<b>FIGURA 19.</b> COMPARAÇÃO DE CROMATOGRAMAS DE AMOSTRAS DE VINHO TINTO COM PADRÕES DE t-RESVERATROL.....	42
<b>FIGURA 20.</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CONCENTRAÇÃO DE t-RESVERATROL ( $\text{mg L}^{-1}$ ) NAS 47 AMOSTRAS DE VINHO TINTO E REPRESENTAÇÃO GRÁFICA NA FORMA DE “BOX-CHART”.....	44
<b>FIGURA 21.</b> CURVA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EQUIVALENTES EM TROLOX.....	46
<b>FIGURA 22.</b> REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (EQUIVALENTES DE TROLOX, MÉTODO ABTS) DAS 47 AMOSTRAS DE VINHO TINTO E REPRESENTAÇÃO GRÁFICA NA FORMA DE “BOX-CHART”.....	48

<b>FIGURA 23.</b> CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS ( $\text{g L}^{-1}$ ) E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (TEAC, $\text{miliM mL}^{-1}$ ) NAS AMOSTRAS ANALISADAS.....	49
<b>FIGURA 24.</b> RELAÇÃO ENTRE VALORES OBTIDOS PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA E VALORES PREVISTOS PELO MODELO COM DADOS CENTRADOS NA MÉDIA E USANDO 5 VARIÁVEIS LATENTES.....	51
<b>FIGURA 25.</b> GRÁFICO DE RESÍDUOS DE “STUDENT” <i>versus</i> “LEVERAGE” OBTIDO PELO MODELO PLS COM 5 VARIÁVEIS LATENTES E OS DADOS CENTRADOS NA MÉDIA.....	52
<b>FIGURA 26.</b> VETOR DE REGRESSÃO OBTIDO NA MODELAGEM DE DADOS CENTRADOS NA MÉDIA COM 4 VARIÁVEIS LATENTES.....	53
<b>FIGURA 27.</b> GRÁFICO DOS VALORES PREVISTOS <i>versus</i> VALORES MEDIDOS PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA PARA O CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO NA ETAPA DE VALIDAÇÃO CRUZADA (A) E PARA O CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA (B).....	54
<b>FIGURA 28.</b> ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS DE VINHO DE 4000 a 500 $\text{cm}^{-1}$ .....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> DESCRIÇÃO DAS VINÍCOLAS, TIPO DE UVA, SAFRAS E ORIGEM DOS VINHOS ANALISADOS.....	24
<b>TABELA 2.</b> RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE PRECISÃO (REPETIBILIDADE) DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS REALIZADA COM UMA AMOSTRA DE VINHO EM QUINTUPLICATA.....	37
<b>TABELA 3.</b> ERROS DE PREVISÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA UTILIZANDO MODELOS DESENVOLVIDOS COM 4 VARIÁVEIS LATENTES E ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA (CM), EM PRIMEIRA DERIVADA (1ª DERIV.) E EM SEGUNDA DERIVADA (2ª DERIV.).....	40
<b>TABELA 4.</b> RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE PRECISÃO (REPETIBILIDADE) DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE t-RESVERATROL REALIZADA COM TRÊS AMOSTRAS DE VINHO.....	43
<b>TABELA 5.</b> RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE PRECISÃO (REPETIBILIDADE) DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS REALIZADA COM OITO AMOSTRAS DE VINHO EM DUPLICATA.....	47
<b>TABELA 6.</b> PREVISÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA UTILIZANDO MODELOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE 5 VARIÁVEIS LATENTES E ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA (CM), EM PRIMEIRA DERIVADA (1ª DERIV.) E EM SEGUNDA DERIVADA (2ª DERIV.).....	50
<b>TABELA 7.</b> PREVISÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA UTILIZANDO MODELOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE 4 VARIÁVEIS LATENTES E ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA (CM) E EM PRIMEIRA DERIVADA (1ª DERIV.).....	52
<b>TABELA 8.</b> PREVISÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS NO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA UTILIZANDO MODELOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE 5 VARIÁVEIS LATENTES E ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA (CM) E EM PRIMEIRA DERIVADA (1ª DERIV.).....	56
<b>TABELA 9.</b> PREVISÃO DO TEOR DE t-RESVERATROL NO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA UTILIZANDO MODELOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE 5 VARIÁVEIS LATENTES E ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA (CM) E EM PRIMEIRA DERIVADA (1ª DERIV.).....	56



<b>TABELA 10.</b>	PREVISÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA UTILIZANDO MODELOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE 5 VARIÁVEIS LATENTES E ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA (CM) E EM PRIMEIRA DERIVADA (1ª DERIV.).....	57
-------------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
ABTS	2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectroscopy</i> (cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa)
CPs	Componentes Principais
DMPD	N,N-dimetil-p-fenilenodiamina
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i> (espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier)
$\text{HCO}_3^\bullet$	Radical bicarbonato
$\text{HO}^\bullet$	Radical hidroxila
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
IC	Índice de Cor
IR	<i>Infrared</i> (na região do infravermelho)
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (lipoproteína de baixa densidade)
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
$\text{NO}^\bullet$	Radical óxido nítrico
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Radical superóxido
$\text{ONOO}^-$	Peroxinitrito
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (análise de componentes principais)
PLS	<i>Partial Least Squares</i> (mínimos quadrados parciais)
$R^2$	Coeficiente de Determinação
R	Coeficiente de Correlação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSEC	<i>Root Mean Square Error of Calibration</i>
RMSECV	<i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i>
RMSEP	<i>Root Mean Square Error Prediction</i>
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i> (espécies reativas de nitrogênio)
$\text{RO}^\bullet$	Radical alcoxila
$\text{ROO}^\bullet$	Radical peroxila

ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (espécies reativas de oxigênio)
SIRT1	Sirtuína 1
SOD	Superóxido Dismutase
STS	Estilbeno Sintase
TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidant activity</i> (capacidade antioxidante equivalente de Trolox)
UV/VIS	Ultravioleta-visível

## RESUMO

Estudos relativamente recentes sugerem que o consumo regular de vinho contribui para a prevenção de doenças cardíacas e neurodegenerativas, principalmente em função da sua elevada concentração de espécies polifenólicas e, conseqüentemente, da sua elevada capacidade antioxidante. Deste ponto de vista, a disponibilização de rotinas de análise que permitam avaliar as referidas características se mostra relevante.

Neste trabalho, 47 amostras de vinhos tintos de diversas safras (2000 à 2008) e procedências foram analisadas, levando-se em consideração os parâmetros de maior relevância na expressão de atividade antioxidante. Assim, características físicas relacionadas com a cor foram medidas por espectrofotometria na região UV-Vis, o teor de polifenóis totais foi avaliado pela técnica espectrofotométrica fundamentada na reação com o reagente de Folin-Ciocalteu, o teor de t-resveratrol foi quantificado por cromatografia em fase líquida de alta eficiência e a capacidade antioxidante foi avaliada espectrofotometricamente (método do ABTS), utilizando procedimento fundamentado na captura do radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico). Posteriormente, as amostras de vinho foram caracterizadas por espectroscopia eletrônica e na região do infravermelho, objetivando-se o desenvolvimento de modelos multivariados orientados à quantificação dos parâmetros em questão.

A aplicação das metodologias convencionais permitiu observar concentrações de polifenóis totais entre 0,97 e 2,91 g L<sup>-1</sup> (equivalentes em ácido glicólico), com valor médio de 1,91 g L<sup>-1</sup>, valores estes bastante similares aos relatados na literatura para vinhos semelhantes. O teor de t-resveratrol variou de 0,14 a 5,18 mg L<sup>-1</sup>, com valor médio de 1,82 mg L<sup>-1</sup>, o que também se encontra dentro dos limites observados em estudos similares. Maiores concentrações deste componente foram observadas em amostras nacionais provenientes da região do Vale dos Vinhedos (Serra Gaúcha), provavelmente em função de fatores climáticos (insolação). A atividade antioxidante variou entre 0,83 e 2,79 miliM (em equivalentes em TROLOX), com valor médio de 2,03 miliM, resultados que também são análogos aos reportados na literatura.

Espectros eletrônicos registrados entre 400 e 800 nm foram processados por rotinas de análise de componentes principais (PCA), observando-se uma boa diferenciação entre vinhos jovens e maduros, principalmente em função de regiões espectrais relacionadas com o parâmetro de Índice de Cor. Modelos multivariados fundamentados em espectroscopia eletrônica e desenvolvidos por rotinas de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) apresentaram uma boa capacidade de previsão da atividade antioxidante, permitindo erros de previsão médios inferiores a 3%. Modelos multivariados, fundamentados em espectroscopia na região do infravermelho médio na

faixa entre 4000 e 600  $\text{cm}^{-1}$ , não apresentaram boa capacidade de previsão para nenhum dos parâmetros avaliados, em função da baixa intensidade de sinal obtida no modo de refletância total atenuada.

## ABSTRACT

Relatively recent studies have suggested that the regular consumption of wine contributes to the prevention of cardiac and neurodegenerative diseases, mainly due to its high concentration of polyphenolic species and, consequently, to its high antioxidant capacity. From this point of view, the availability of analysis routine which permits to evaluate referred characteristics is relevant.

In this work, 47 samples of red wines from several vintages (2000 - 2008) and provenances were analyzed, taking into account the most relevant parameters on the expression of antioxidant activity. Thus, physical characteristics related to the color were measured by spectrophotometry on the UV-Vis region, the total polyphenols content was evaluated by the spectrophotometric technique based on the reaction with Folin-Ciocalteu reagent, the t-resveratrol content was quantified by high performance liquid chromatography and the antioxidant capacity was spectrophotometrically evaluated (ABTS method), using a procedure based on the capture of 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical. Posteriorly, the wine samples were characterized by electronic spectroscopy and infrared, aiming at the development of multivariate models for quantification of the concerned parameters.

The application of the conventional methodologies permitted to predict total polyphenols concentrations between 0.97 and 2.91 g L<sup>-1</sup> (equivalents in glycolic acid), with mean value of 1.91 g L<sup>-1</sup>, very similar to the ones related in the literature for similar wines. The t-resveratrol content varied from 0.14 to 5.18 mg L<sup>-1</sup>, with mean value of 1.82 mg L<sup>-1</sup>, which is also in accordance with similar studies. Higher concentrations of this component were observed in national samples from the Vale dos Vinhedos region (Serra Gaúcha), probably due to climatic factors (insolation). The antioxidant activity varied between 0.83 and 2.79 milIM (in equivalents in TROLOX), with mean value of 2.03 milIM, results which are also analogous to the ones reported in the literature.

Electronic spectra recorded between 400 and 800 nm were processed by routines of principal components analysis (PCA), in which a good differentiation between young and mature wines was observed, especially due to spectral regions related to the parameter Color Index. Multivariate models based on electronic spectroscopy and developed by regression routines by partial least squares (PLS) presented a good prediction ability of the antioxidant activity, allowing medium prediction errors lower than 3%. Multivariate models based on infrared spectroscopy didn't present a good prediction capacity to any of the evaluated parameters due to the low intensity of the signal obtained in the mode of attenuated total reflectance.

## 1. INTRODUÇÃO

---

Estudos demonstram que existe uma relação muito próxima entre uma alimentação equilibrada, rica em frutas e verduras, com uma menor incidência de doenças crônicas e degenerativas. Entre os principais responsáveis pelo efeito benéfico e “protetor” dos alimentos estão compostos antioxidantes, dentre os quais se destacam o caroteno, a vitamina C, a vitamina E e a maioria dos compostos fenólicos. Por este motivo, uma nova categoria de alimentos foi estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desde 1991. A Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde estabelece, por meio da Portaria nº 398 (30/04/99), as principais características dos alimentos funcionais, destacando a presença de ingredientes que, além das funções nutricionais básicas, produzam efeitos metabólicos e fisiológicos benéficos à saúde (ANVISA, 2001).

Dentro deste grupo é possível destacar o vinho, produto que se caracteriza por apresentar nutrientes indispensáveis para o bom funcionamento do organismo humano, tais como vitaminas (B1, B2 e B12), aminoácidos (lisina, fenilalanina, triptofano e ácido glutâmico) e espécies antioxidantes. Alguns compostos fenólicos encontrados no vinho são antioxidantes e contribuem para a prevenção de doenças cardiovasculares. Outros, tais como o t-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), vêm sendo exaustivamente estudados nos últimos anos, em razão da sua ação preventiva em relação a doenças como câncer, arteriosclerose, reumatismo e doenças degenerativas, como mal de Parkinson (SAIKO *et al.*, 2008).

Em função das características acima salientadas, inúmeras metodologias de análise têm sido propostas para avaliar a capacidade antioxidante de vinhos, assim como para quantificar o teor de t-resveratrol. Usualmente, a capacidade antioxidante é avaliada espectrofotometricamente, medindo-se a captura de radicais livres produzidos a partir de ABTS radical (2,2 azinobis (3-etilbenzoatiazolina –6- ácido sulfônico)), DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e DMPD (radical N,N-dimetil-p-fenilenodiamina). Embora consolidados, estes procedimentos se apresentam demorados e dispendiosos, característica esta última devida à necessidade de reagentes especiais. Por sua vez, a quantificação de t-resveratrol costuma ser realizada por técnicas de cromatografia em fase líquida, usualmente associada à detecção espectroscópica, quimiluminiscente, eletroquímica ou fluorimétrica.

O presente projeto de pesquisa objetiva a caracterização de vinhos, principalmente da região do Rio Grande do Sul, em relação à capacidade antioxidante e ao teor de fenóis totais e t-resveratrol, utilizando espectroscopia eletrônica e na região do infravermelho, associados a ferramentas de calibração multivariada.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1. HISTÓRICO DO VINHO

Antecedentes arqueológicos fazem supor que a produção de vinhos date de mais de sete mil anos, tendo sua principal origem na região sul da cordilheira do Cáucaso, que vai do leste Europeu até a Ásia Oriental, entre o mar Negro e o Cáspio, passando pela Capadócia, região histórica da Anatólia central, a qual atualmente faz parte da Turquia (CARLAN, 2008).

A etimologia da palavra vinho tem origem no latim (*Vinu*), a qual deriva da expressão grega *Oinos*, que significa suco fresco da uva. O cultivo da uva foi expandido com a migração dos povos originários da Índia, aproximadamente em 300 A.C. O Império Elamita durante séculos foi consolidado pelo comércio, dissipando a cultura de apreciação do vinho que seguiu o caminho do comércio e dos povos, estando presente na alimentação, costumes e ritos de várias civilizações. Antigos textos egípcios, por exemplo, relatam o preparo de alimentos e o consumo de vinho, enquanto que túmulos de egípcios com maior ordem de nobreza continham recipientes de vinho, com informações de procedência e ano da colheita (CARLAN, 2008).

A popularização do vinho aconteceu na antiguidade, principalmente em função da expansão militar e da conquista de novos territórios pelo império romano. Estes movimentos migratórios permitiram a exportação de costumes e de alimentação, além das práticas de comércio. A Grécia também participou da rota do vinho. Em função de dificuldades encontradas para a prática da agricultura, a dieta mediterrânea se fundamentou no uso de trigo, azeite de oliva e vinho, alimentos que são utilizados até hoje. Foi na Grécia que Hipócrates descreveu as propriedades medicinais dos vinhos. No período de 131-201 D.C., o famoso médico grego dos gladiadores, Galeno, depois conhecido por se tornar médico do imperador Marco Aurélio, escreveu um tratado denominado “Deantídotos”, com preparações à base de vinhos e ervas usadas como antídotos de venenos.

Durante a Idade média, por volta de 1300 D.C., foi impresso o primeiro livro sobre vinhos (*Liber de Vinus*), escrito pelo catalão Arnaldus de Villanova, médico e professor da Universidade de Montpellier. O livro descrevia propriedades curativas de vinhos aromatizados com ervas para algumas doenças (CARLAN, 2008).

Após as descobertas de Louis Pasteur (1822-1895) sobre microorganismos e o processo de fermentação, publicadas na sua obra “*Études sur le Vin*” (GOUVEIA-MATOS, 1997), o século XX presenciou grandes avanços tecnológicos no vinhedo e nas vinícolas. Nos anos 70, constatou-se que o Novo Mundo era capaz de competir com as regiões clássicas européias na alta qualidade de vinhos. Ao mesmo tempo, a produção



em grande escala resultou em queda na qualidade, mas os anos 80 e 90 trouxeram novos progressos técnicos e o novo milênio anunciou qualidade e confiabilidade. Nos anos 90, percebeu-se que os bons vinhos não resultam apenas de um bom processo de fabricação, mas também de cuidados com os vinhedos. A poda para garantir safras pequenas, o equilíbrio entre a vinha e seu ambiente e a viticultura orgânica/biodinâmica aumentam a qualidade (KEEVIL *et al.*, 2006).

No fim do século XX, o mundo tinha mais de oito milhões de hectares de vinhas e produzia quase 300 milhões de hectolitros de vinho. Do Chile à África do Sul, Nova Zelândia e China, os melhores vinhos são produzidos na região global dos paralelos 32° e 42° no sul (KEEVIL *et al.*, 2006).

A Europa mediterrânea é o coração da viticultura, com 240 horas de luz solar por mês, uma média de 17°C de temperatura no período dos plantios, índice pluviométrico anual de cerca de 600 mm e frio seco no inverno, que proporcionam às vinhas uma hibernação e as condições perfeitas para produção dos melhores vinhos do mundo (KEEVIL *et al.*, 2006).

Os países mais tradicionais na produção e consumo de vinho são a França, a Itália e a Espanha. Nos últimos 30 anos, entretanto, houve uma queda considerável no consumo. Primeiro, porque a qualidade da água melhorou e o vinho deixou de ser uma bebida genérica. Segundo, o vinho não é mais visto como fonte nutricional, mas como um empecilho ao desempenho profissional e por último, houve um declínio no consumo da bebida nos cafés. Além disso, para combaterem a superprodução e o crescente estoque de vinhos na Europa, os produtores reduziram a quantidade e aumentaram a qualidade, passando de produto de consumo para produto de degustação.

Ao contrário dos países tradicionais, o mundo de língua inglesa aumentou seu consumo. Como exemplo, temos o Reino Unido que aumentou o consumo em mais de 500% desde 1970. Essa popularidade é resultado direto da grande quantidade de vinhos acessíveis, maduros e frutados oferecidos à população, pela facilidade de obtenção e o baixo preço no mercado (KEEVIL *et al.*, 2006).

Segundo a União Brasileira de Viticultura (UVIBRA - <http://www.uvibra.com.br>), o consumo de vinho no Brasil vem aumentando consideravelmente. Em 2007 foram produzidos aproximadamente 3180 milhões de litros de vinho, um aumento de 46% em relação à produção vinícola de 2006.

No Brasil, o Rio Grande do Sul concentra mais de 90% da produção vinícola do país e lá estão as melhores vinícolas brasileiras. A maior parte dessas vinícolas está localizada na Serra Gaúcha, região de montanha ao norte no estado, onde se destacam as cidades de Bento Gonçalves, Garibaldi e Caxias do Sul, seguidas de Flores da Cunha, Farroupilha e Canela, e o restante está localizado em Erechin, no noroeste do estado,

Jaguari, no sudoeste, Viamão e São Jerônimo, no centro-leste, Bagé, Don Pedrito, Pinheiro Machado e Santana do Livramento, no extremo sul. Uma pequena parte restante dos vinhos brasileiros é proveniente de diminutas regiões vitivinícolas situadas nos estados de Minas Gerais (municípios de Andradadas, Caldas, Poços de Caldas e Santa Rita de Caldas), Paraná, Pernambuco (Santa Maria da Boa Vista e Santo Antônio), Santa Catarina (Urussanga) e São Paulo (Jundiaí e São Roque). No entanto, essas regiões cultivam quase que exclusivamente uvas americanas (Isabel, Niágara, etc.), que originam apenas vinhos de categoria inferior. Algumas vinícolas começaram a produzir vinhos elaborados com uvas européias, mas ainda necessitam de tecnologia para oferecer vinhos de boa qualidade (VINHOS. Disponível em: <[http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/trabalhos\\_grad/trabalhos\\_grad\\_2006-2/vinhos.htm#\\_Toc157876069](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad/trabalhos_grad_2006-2/vinhos.htm#_Toc157876069)> Acesso em: 06 mar. 2009).

No quadro vinícola descrito para as regiões fora do Rio Grande do Sul existe uma feliz exceção situada no Nordeste brasileiro. É o promissor Vale do Rio São Francisco, especialmente na cidade de Santa Maria da Boa Vista, próxima de Petrolina e Juazeiro, na fronteira de Pernambuco e Bahia (VINHOS. Disponível em: <[http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/trabalhos\\_grad/trabalhos\\_grad\\_2006-2/vinhos.htm#\\_Toc157876069](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad/trabalhos_grad_2006-2/vinhos.htm#_Toc157876069)> Acesso em: 06 mar. 2009).

Paralelamente ao papel que o vinho representou e representa na mesa, na religião e na economia dos povos, hoje o vinho é indicado por médicos como uma bebida salutar. Fato que não é novidade, pois Dioscórides, o pai da farmacologia, no século I da nossa era, e Hipócrates de Cós, o pai da medicina, séculos antes, já mencionavam seu papel como medicamento.

## 2.2. PRODUÇÃO DE VINHO

A produção do vinho é um delicado conjunto de procedimentos e reações que influenciam diretamente em sua consistência, sabor e aroma. Podemos descrever como os principais processos:

**Maturação:** Inicia-se pelo crescimento da baga, que perde a clorofila, torna-se translúcida e elástica à pressão. Progressivamente, assume cor típica da cepa, acompanhada pelo aumento de açúcar e rápida diminuição de acidez, em virtude de fenômenos de diluição, combustão málica e a salificação (aumento de minerais). A maturação máxima também apresenta quantidades ideais de açúcares, componentes fenólicos, antocianinos e aromas, criando a personalidade do vinho (CORDONNIER, 2007).

**Esmagamento e desengaço das uvas:** Ao chegarem, os cachos são transportados por uma tremonha de recepção até um esmagador/desengaçador, onde as uvas são esmagadas por rolos para se expor o sumo rico em açúcares às leveduras e aos engaços. Esses são então removidos, e o suco (mosto) é peneirado através de um cilindro rotativo perfurado.

**Adição de leveduras ao mosto:** há leveduras necessárias à fermentação na pele das uvas. Caso se prefira usar leveduras cultivadas, elas são adicionadas ao mosto nessa etapa para dar início à fermentação (KEEVIL *et al.*, 2006).

**Maceração:** A anaerobiose dos grãos intactos constitui a fase de maceração. O grão da uva é local de uma transformação péctica: quando amolece, os colorantes e os taninos da casca se difundem nos vacúolos das células da polpa, uma parte significativa de ácido é degradada e o açúcar intracelular é fermentado, produzindo cerca de 1% a 2% de etanol. A uva é submetida a várias agressões mecânicas, que geram consequências inadequadas. Provocam a desorganização celular que libera diversos sistemas enzimáticos do tipo oxidase e oxigenase e seus substratos polifenólicos e ácidos gordurosos insaturados geradores de produtos da oxidação (CORDONNIER, 2007).

**Fermentação:** Transformação, pela levedura, dos açúcares em álcool e produtos secundários e degradação, pelas bactérias lácticas, do ácido málico em láctico. Estas etapas chamadas de fermentações alcoólica e málica, respectivamente.

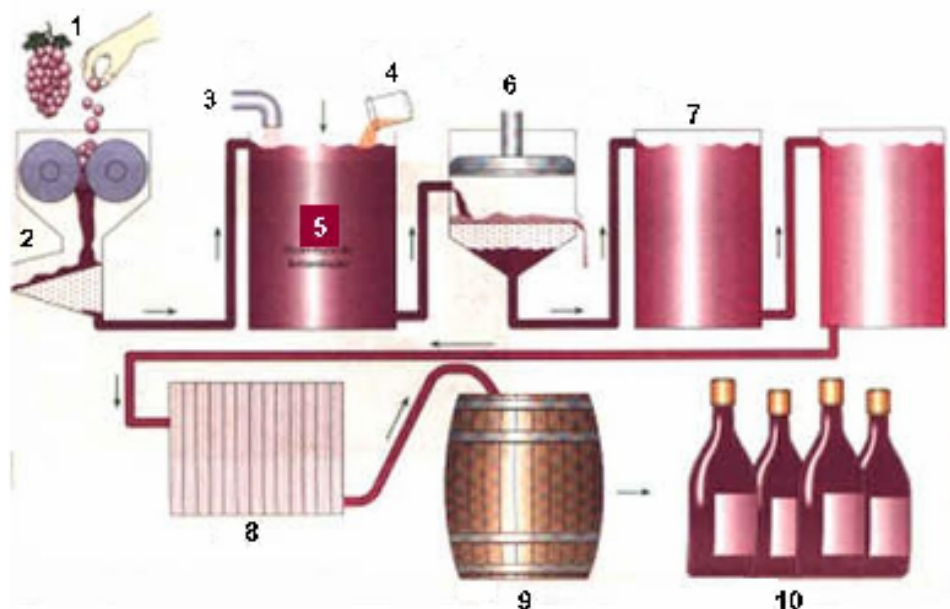
O vinho é considerado biologicamente estável quando não contém mais açúcares fermentáveis nem ácido málico. A fermentação malolática diminui a acidez do vinho (um diácido transforma-se em monoácido).

Deve haver um equilíbrio entre as duas fermentações, de modo que a fermentação alcoólica não seja tão lenta, mas sim rápida e completa antes que as bactérias lácticas tomem o lugar das leveduras no meio. É preciso acelerar as leveduras e frear temporariamente as bactérias com anidrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>), processo denominado sulfitagem. O número de leveduras é multiplicado por um fator de 10 a 100 em relação ao que era na uva, o que representa de 10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> germes por mL de sumo. O meio é então ocupado pela espécie *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (*Saccharomyces ellipsoideus* para os enólogos) (CORDONNIER, 2007).

**“Bâtonnage”:** O depósito de leveduras que resta após a fermentação pode ser misturado ao vinho para estimular sabores adicionais (KEEVIL *et al.*, 2006).

**Prensagem:** Quando já foram extraídos álcool, corantes, taninos e sabores suficientes, o suco é transferido para outro recipiente. Os resíduos que permanecem no tanque são então prensados, produzindo um líquido espesso e escuro, o vinho de prensa. Ele pode ser adicionado ao suco durante a mistura para aumentar o tanino e a coloração (KEEVIL *et al.*, 2006).

Um esquema representativo das principais etapas envolvidas na preparação do vinho é apresentado na Figura 1.



**FIGURA 1.** ESQUEMA REPRESENTATIVO DAS PRINCIPAIS ETAPAS DA PRODUÇÃO DE VINHO TINTO (1. COLHEITA DAS UVAS, 2. ESMAGAMENTO, 3. ADIÇÃO DE SULFITO, 4. ADIÇÃO DE FERMENTO, 5. FERMENTAÇÃO, 6. PRENSAGEM, 7. CLARIFICAÇÃO, 8. FILTRAÇÃO, 9. ENVELHECIMENTO, 10. ENGARRAFAMENTO). FONTE: [HTTP://WWW.PROFCUPIDO.HPG.IG.COM.BR/BIOQUIMICA FERMENTACAO.HTM](http://www.profcupido.hpg.ig.com.br/bioquimicafermentacao.htm)

O vinho é feito segundo diferentes estilos e com muitos graus de qualidade. As técnicas vinícolas estão tão avançadas que, tendo acesso às cepas adequadas, um vinicultor pode elaborar vinhos "nobres" ou pode combiná-los com vinhos de outros vinhedos para produzir quantidades mais comerciais. Cada produto tem diferentes vantagens. Os vinhos mesclados têm o potencial de se tornar "marcas" mundiais. A arte da mescla consiste em fazer com que cada safra e cada lote sejam bem parecidos com os anteriores. Nesses vinhos, a confiabilidade é prioritária. Por serem feitos em grandes quantidades, eles são infinitamente mais acessíveis e mais amplamente distribuídos. Contudo, os puristas afirmam que os vinhos regionais apresentam mais diversidade e são um reflexo fiel de sua terra e cultura. Feitos em menor escala, são mais difíceis de serem obtidos e podem ser significativamente mais caros e também sofrem significativas transformações no sabor quando envelhecidos por alguns anos (KEEVIL *et al.*, 2006).

### 2.3. ESTRESSE OXIDATIVO E PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DO VINHO

No organismo humano ocorrem inúmeras reações químicas, sendo que a principal delas é a oxidação biológica a fim de se obter energia. O efeito do oxigênio sobre o processo de oxidação produz Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), que se dividem em dois grupos: os radiculares, peróxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ), alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ ), hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ), e os não-radicalares: peróxido de hidrogênio, oxigênio e ácido hipocloroso. Também há formação de Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS), dentre as quais se incluem o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), peroxinitritos ( $\text{ONOO}^\bullet$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) e ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) (CADET *et al.*, 1999). Além de outras formas atômica(s) e/ou molecular(es) que possuem um ou mais elétrons não pareados, conhecidos como radicais livres, responsáveis por inúmeros danos celulares (HAMID *et al.*, 2002).

Os radicais livres geralmente são gerados na mitocôndria, citoplasma ou membrana celular e podem atacar o DNA, carboidratos, proteínas e lipídeos (ANDERSON, 1996; YU & ANDERSON, 1997). As mitocôndrias são as principais fontes de radicais  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e, como a presença deste ânion-radical pode causar sérios danos, elas são ricas na enzima superóxido dismutase (SOD) que converte os radicais em  $\text{H}_2\text{O}_2$  (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O radical  $\text{HO}^\bullet$  é um dos mais prejudiciais ao organismo, pois possui alta reatividade e ataca as moléculas por abstração dos hidrogênios e por adição a ligações insaturadas. A formação do radical  $\text{HO}^\bullet$  se dá pela reação de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que isoladamente no meio celular é praticamente inócuo e se difunde pela membrana celular, com metais de transição, geralmente  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Cu}^{+2}$ . O  $\text{Fe}^{+2}$  é um dos íons mais biodisponíveis, sendo encontrado em proteínas de transporte (transferrina) e armazenamento (ferritina e hemosiderina). A reação do  $\text{Fe}^{+2}$  com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é conhecida como processo *Fenton*. Outra via de formação do radical  $\text{HO}^\bullet$  é a homólise da água pela exposição à radiação ionizante. A radiação ultravioleta produz radicais  $\text{HO}^\bullet$  nas células da pele e a radiação gama e os raios X produzem radicais  $\text{HO}^\bullet$  no local onde incidem (processo *Foto-fenton*). Todos esses fatores podem causar alterações e mutações gênicas provocando inúmeros tipos de doenças (HUSAIN *et al.*, 1987; HALLIWELL, 1992).

Sabe-se que a forma mais prejudicial do oxigênio ao organismo é o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), pois é a causa ou o intermediário da toxicidade fotoinduzida do  $\text{O}_2$  em organismos vivos. Seu tempo de meia-vida depende muito do meio onde se encontra. Em meio aquoso, sua meia-vida é muito pequena, pois ele se choca com as moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  transferindo sua energia, desativando-se e retornando à forma de oxigênio tripleto. Em meio orgânico é mais comum a ocorrência de choque com transferência de energia,

sem reação química, seguida da dissipação dessa energia na forma de calor. Esse tipo de choque é denominado *quenching* colisional e representa a maneira como a água desativa o  $^1\text{O}_2$ . Porém, em meio orgânico, a meia-vida do oxigênio singlete é maior e, portanto, ele pode causar algumas reações químicas com determinados aceptores por incorporação do  $\text{O}_2$ . Os compostos naturais mais reativos frente ao  $^1\text{O}_2$  são os carotenóides, devido às múltiplas insaturações conjugadas. Assim, o  $^1\text{O}_2$  reage mais lentamente com os ácidos graxos do que com o  $\beta$ -caroteno e quanto maior o número de insaturações presentes nos ácidos graxos, mais rapidamente eles irão reagir. Essa reação se dá por incorporação do oxigênio à cadeia lipídica com consequente migração da ligação dupla, formando ácidos hidroperóxidos como os HPODE (ácidos hidroperoxioctadecadienólicos) (LARSON, 1997).

Através da redução de quelatos de  $\text{Fe}^{+3}$ , formando íons  $\text{Fe}^{2+}$  ou facilitando a biodisponibilização de  $\text{Fe}^{+2}$  através da liberação deste das proteínas transportadoras e armazenadoras, o radical superóxido ( $\text{O}_2^\bullet$ ) auxilia na formação dos radicais  $\text{HO}^\bullet$  por meio da reação de Haber-Weiss (HALLIWELL, 1992; KEHRER, 2000). Os radicais superóxido podem produzir íons peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) através da reação do radical  $\text{HO}^\bullet$  com o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ).

O radical óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) pode ser produzido no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintase a partir de L-arginina, oxigênio e NADPH, gerando também  $\text{NADP}^+$  e citrulina. Esse radical também pode ser produzido em maiores quantidades através dos fagócitos humanos, quando estimulados (CADET *et al.*, 1999). O nitrato pode transformar-se em nitrito, que reage com os ácidos gástricos gerando o ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ). O óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) também é precursor do  $\text{HNO}_2$  através da sua reação com a água. O  $\text{HNO}_2$  promove a desaminação das bases do DNA que contêm grupo  $\text{NH}_2$  livre, que são citosina, adenina e guanina, formando uracila, hipoxantina e xantina, respectivamente (CADET *et al.*, 1999; HALLIWELL, 2001). O óxido nítrico  $\text{NO}^\bullet$  não é suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente, mas pode reagir com o radical ânion superóxido  $\text{O}_2^\bullet$  produzido pelos fagócitos, gerando peroxinitrito. Este último, por sua vez, pode sofrer reações secundárias, formando agentes capazes de nitrar os aminoácidos aromáticos, a exemplo da tirosina, gerando nitrotirosina e as bases do DNA, em particular a guanina, na qual o produto principal é a 8-nitroguanina (EISERICH *et al.*, 1996). A presença do tampão  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  contribui para a nitração de biomoléculas, pois o carbonato ao ser protonado forma o radical  $\text{HCO}_3^\bullet$  e este oxida anéis aromáticos, produzindo bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e o radical aromático correspondente, facilitando a entrada do radical  $\text{NO}_2^\bullet$  (DENICOLA *et al.*, 1996).

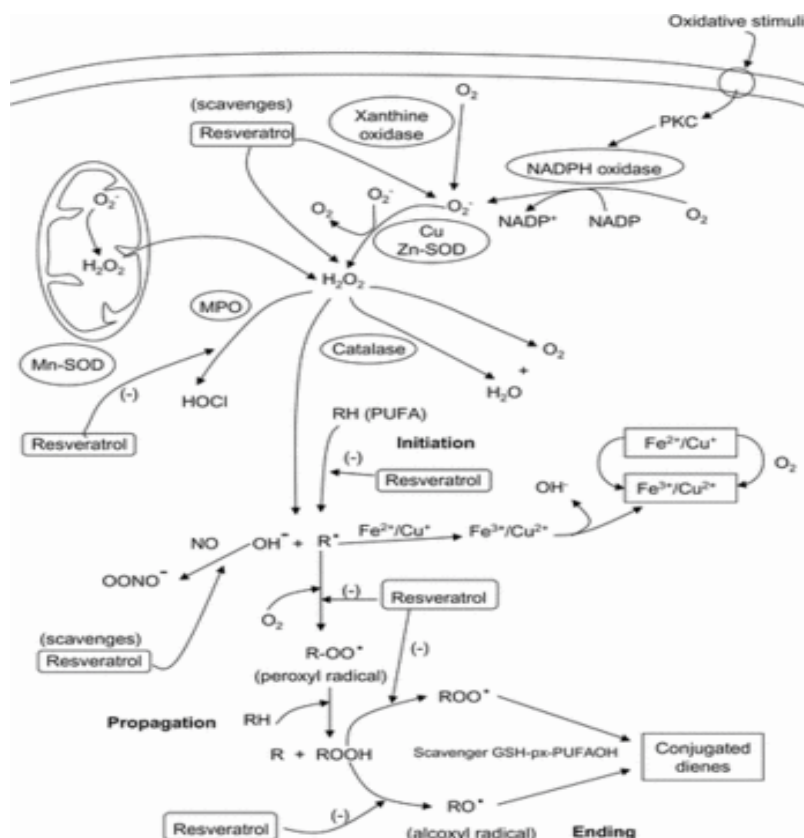
A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela

exposição a fatores exógenos, como radiação gama e ultravioleta, ozônio, medicamentos, cigarro e dieta. Para tentar reverter esse tipo de dano causado pelos radicais livres o organismo produz enzimas que catalisam as reações, inativando os radicais (NEPOMUCENO *et al.*, 1999). Contudo, na condição de pró-oxidante, a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (CERUTTI, 1994). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (SIES, 1993; HALLIWELL, 1996).

O estresse oxidativo está envolvido na incidência de doenças como o câncer, arteriosclerose, reumatismo, artrite, artrose e a doenças degenerativas como Parkinson e Alzheimer, entre outras (ARUOMA, 1998; BILICI *et al.*, 2001; EL-SHERBINY *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2004).

Um esquema representativo da geração de espécies radicalares durante o processo metabólico mitocondrial é apresentado na Figura 2.

O estudo de substâncias que possuem propriedades antioxidativas vem aumentando nos últimos anos para tentar diminuir o efeito desse estresse e aumentar a qualidade de vida da população. Nos últimos anos uma atenção especial foi dada a alimentos. A partir de 1991, a ANVISA criou a denominação “Alimentos Funcionais ou Nutracêuticos”, onde a alimentação está relacionada diretamente com a saúde do indivíduo. Pesquisas mostram que extratos brutos de plantas ou componentes isolados de alimentos podem auxiliar na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (DESMARCHELIER *et al.*, 1997; ZHENG & WANG, 2001; PAREJO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005). Essas substâncias antioxidantes, como por exemplo: compostos fenólicos demonstraram grande eficácia antioxidante em meios radicalares (HUNT *et al.*, 2001; VALENTÃO *et al.*, 2002; HEILMANN *et al.*, 2003; ATHANASAS *et al.*, 2004; GAMIOTEA-TURRO *et al.*, 2004; VALENTÃO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005).



**FIGURA 2.** ESQUEMA REPRESENTATIVO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES RADICAIS DURANTE O PROCESSO METABÓLICO MITOCONDRIAL (FONTE: FEILLET-COUDRAY *ET AL.*, 2009).

O vinho apresenta uma complexidade de aproximadamente 500 substâncias até agora identificadas, destacando a presença de oxidantes, redutores e catalisadores (enzimáticos ou metálicos) de oxirredução, colóides, ácidos orgânicos, enzimas, substratos e íons, que são herdados com variações dependentes da cepa de origem (CORDONNIER, 2007). Compostos fenólicos, taninos e antocianos constituem o segundo passo da personalidade do vinho, intervindo no sabor, na textura e na cor do vinho.

O vinho é rico em compostos antioxidantes, tanto em sistemas lipofílicos como em sistemas aquosos. Alguns estudos comprovaram a eficiência dos compostos fenólicos do vinho em inibir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). A forma oxidada da LDL é que transporta o colesterol e está diretamente relacionada a problemas coronários e acidentes vasculares cerebrais, devido ao seu acúmulo na região interna das artérias (STEINBERG *et al.*, 1989). Alguns estudos mostraram que a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) por radicais livres oriundos da reação de  $\text{Cu}^{2+}$  foi inibida pelos



compostos fenólicos (FRANKEL *et al.*, 1993). Vinhos produzidos com um longo período de maceração mostraram-se 60% mais eficientes na inibição da oxidação de membranas (MAMEDE & PASTORE, 2004).

Pesquisas com humanos mostraram que a concentração de polifenóis no plasma aumentou significativamente após a ingestão de vinho tinto. A concentração de catequina (+), o constituinte fenólico mais abundante do vinho tinto, aumentou de 2 nmol/L para  $91 \pm 14$  nmol/L em nove voluntários saudáveis, após o consumo de 120 mL de vinho tinto (DONOVAN *et al.*, 1999).

Houve a inibição de células cancerígenas com o uso de polifenóis isolados do vinho tinto e concentrações baixas inibiram o crescimento de células epiteliais do cólon, onde essa inibição do crescimento celular está relacionada com a interferência do polifenol no mecanismo de ação sobre a proteína quinase intra e extracelular, o que indica o caráter antiproliferativo dos compostos fenólicos do vinho (BRIVIBA *et al.*, 2002). Estes resultados podem servir de base para a explicação do fenômeno do paradoxo francês, onde a população, mesmo ingerindo grandes quantidades de colesterol, apresenta uma pequena incidência de doenças coronárias e acidentes vasculares, devido ao consumo de pequenas porções de vinho tinto durante a semana. Estudos realizados demonstraram que a ingestão de 25 a 50 mg de polifenóis por dia proporciona menor risco de doenças do coração (JANG *et al.*, 1997).

Um dos grupos responsáveis por tais benefícios são os estilbenos. Estilbenos são compostos que fazem parte da classe dos polifenóis classificados como fitoalexinas. Estas fitoalexinas são produzidas pela uva em resposta a agressões externas (processos mecânicos, fungos (*Botrytis cinérea*) ou mesmo pela ação de radiação ultravioleta). Os estilbenos são representados por: t-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxistilbeno), piceid (trans-3,5,4'-trihidroxistilbeno-3-O- $\beta$ -D-glucosídeo) e astringina(3'-hidróxi-3,5,4'-trihidroxistilbeno-3-O- $\beta$ -D-glucosídeo). O piceid é um glicosídeo derivado do t-resveratrol com propriedades semelhantes na inibição da oxidação da LDL e agregação plaquetária. O trans-astringin apresenta um grupo hidroxila adicional. A concentração dos estilbenos nos vinhos varia de acordo com a variedade, a origem geográfica, o ataque de fungos e o processo de vinificação e conservação (SPINELLI *et al.*, 2006). O t-resveratrol ocorre naturalmente em várias espécies de plantas, porém as uvas e seus derivados representam uma importante fonte na dieta alimentar.

### 2.3.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, na forma simples ou de polímeros, o que lhes confere uma estrutura antioxidante. Antioxidantes são compostos que podem inibir ou reduzir a oxidação de

células e moléculas, evitando a propagação de uma reação em cadeia. Esses compostos podem ser naturais ou sintéticos (ANTUNES & CANHOS, 1983; SIMÃO, 1985; FENNEMA, 1993; BRENNAN & PAGLIARINI, 2001; ZHENG & WANG, 2001) e agem quelando o oxigênio triplete e singleto ou decompondo peróxidos (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. A atividade dos antioxidantes, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais) (MAMEDE & PASTORE, 2004).

Quando encontrados em vegetais, os compostos fenólicos podem estar na forma complexada com açúcares e proteínas ou em sua forma isolada. Os compostos fenólicos de origem vegetal podem ser classificados em flavonóides e não flavonóides. Os flavonóides são os que apresentam estrutura química  $C_6-C_3-C_6$ . Os compostos classificados como não flavonóides são separados em três classes: derivados da estrutura química  $C_6-C_1$ , como o ácido hidroxibenzóico, o ácido elágico e o ácido gálico; derivados da estrutura química  $C_6-C_3$ , como o ácido cafêico, os hidroxicinamatos e o ácido *p*-cumárico, e ainda os derivados da estrutura química  $C_6-C_2-C_6$ , como o *trans*-resveratrol, o *cis*-resveratrol e o *trans*-resveratrol-glucosídeo.

Em pesquisas, alguns flavonóides se apresentam associados com a proteção contra doenças do envelhecimento. A formação de radicais livres pelo oxigênio é supostamente a chave para o desenvolvimento de doenças como o câncer e cardiopatias. Os radicais livres podem atacar biomoléculas, dentre as quais se destacam as proteínas, os lipídeos e o próprio DNA, os quais podem ser preservados pela ação dos antioxidantes (BIRCH *et al.*, 2001; BRENNAN & PAGLIARINI, 2001; KOO & SUHAILA, 2001; VAN DER SLUIS *et al.*, 2001; VINSON *et al.*, 2001; YILDIRIM *et al.*, 2001; ZHENG & WANG, 2001; SELLAPPAN *et al.*, 2002).

As frutas que apresentam principalmente a coloração azul/vermelha são as mais importantes fontes de compostos fenólicos em dietas alimentares, especialmente os derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico, como as antocianinas, os flavonóides, as catequinas e os taninos (hidrolisados ou condensados). Muitos destes compostos apresentam uma grande gama de efeitos biológicos, incluindo ações antioxidantes, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora. Os compostos fenólicos apresentam diversas funções de defesa para as plantas, não somente contra agentes do meio ambiente (luz, temperatura e umidade), mas para fatores internos, incluindo diferenças genéticas, nutrientes, hormônios, contribuindo para a sua síntese (BURNS *et*

*al.*, 2001; KÄHKÖNEN *et al.*, 2001; ZHENG & WANG, 2001; VAN DER SLUIS *et al.*, 2001; AHERNE & O'BRIEN, 2002; SELLAPPAN *et al.*, 2002).

Sob o ponto de vista nutricional, os flavonóides são reconhecidamente agentes antioxidantes capazes de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além de reduzirem significativamente a tendência a doenças trombóticas (RAUHA *et al.*, 2000).

Os efeitos bioquímicos e farmacológicos dos flavonóides são muito vastos, destacando-se as ações antioxidante, anti-inflamatória e antiplaquetária, além de efeitos antialérgicos. Os flavonóides podem inibir enzimas como a prostaglandina sintetase, a lipo-oxigenase e a ciclo-oxigenase, todas relacionadas diretamente com a tumorigênese. Também têm poder de induzir enzimas do sistema desintoxicante como a glutathione-transferase. Quando em alimentos, os flavonóides agem de forma a poupar o consumo de vitamina C, evitando a formação de radicais livres (KOO & SUHAILA, 2001).

A quantidade de compostos fenólicos no vinho tinto é maior (1000-4000 mg/L) do que no vinho branco (200-300 mg/L) (BRAVO, 1998). As uvas tintas contêm em sua composição as antocianinas, moléculas responsáveis pela pigmentação (ausentes, portanto, em uvas brancas). A diferença na quantidade de compostos fenólicos dos vinhos tintos e brancos não se deve apenas à presença das antocianinas, mas também aos processos de fabricação para obtenção do vinho.

Em alguns tipos de vinho tinto as uvas são esmagadas com o engaço, casca e semente, gerando maior quantidade de compostos fenólicos (FRANKEL *et al.*, 1995). Segundo AMERINE & JOSLYN (1987), o engaço contém de 1 a 4%, a casca cerca de 1 a 2% e as sementes 5 a 8% de compostos fenólicos.

O método mais prático e utilizado até hoje para determinação de polifenóis totais é o de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965) ou o Folin-Ciocalteu modificado (BUDINI *et al.*, 1980).

### **2.3.1.1. Antocianinas**

Em vinhos, a cor é uma característica essencial, podendo demonstrar a qualidade e até mesmo indicar alguns compostos químicos presentes em sua composição, como é o caso dos flavonóides. Eles são compostos que possuem esqueleto básico com 15 átomos de carbono ( $C_6-C_3-C_6$ ), os quais podem ser classificados em função do estado de oxidação do anel central.

Uma das classes de flavonóides mais conhecidas e estudadas em vinhos é a das antocianidinas. Os pigmentos encontrados em vinhos geralmente são as antocianinas, que são derivados das antocianidinas. A diferença entre as duas é que as antocianidinas não possuem grupos glicosídeos e, na sua maioria, as hidroxilas estão ligadas nas

posições 3, 5 e 7, as quais nunca devem estar todas hidroxiladas ao mesmo tempo, pois uma das posições dos grupos hidroxila deve permanecer livre para formação do grupo quinoidal, responsável pela cor (BROUILLARD, 1982). Nas antocianinas uma ou mais dessas hidroxilas estão ligadas a açúcares (glicose, xilose, arabinose, galactose, etc.), que melhoram sua solubilidade em água. Esses açúcares podem estar ligados a ácidos fenólicos (*p*-coumárico, cafêico, fenílico e vanílico). Existem aproximadamente 400 tipos diferentes de antocianinas (KONG *et al.*, 2003).

Nas uvas a composição das antocianinas difere com a espécie, maturidade, condições climáticas, entre outros fatores. A quantidade varia entre 30 e 750 mg por 100 g de fruta madura (MAZZA, 1995). Uma característica expressiva das antocianinas é a cor intensamente avermelhada observada nas uvas e seus derivados. As antocianinas, ao contrário dos flavonóides, absorvem intensamente na região visível do espectro. Cada espécie de uva contém um grupo de antocianinas específicas que ajudam a caracterizar o sabor, o aroma e a cor das bebidas. Os ácidos fenólicos e alguns tipos de ácidos não-antociânicos contidos em bebidas derivadas de uva ajudam a aumentar a estabilidade contra a descoloração. Estudos mostram que a composição química do vinho (principalmente oxigênio, açúcares e minerais) e o armazenamento inadequado interferem nas estruturas das antocianinas alterando sua coloração.

Segundo MESCHTER (1954), alguns açúcares ajudam a decompor pigmentos, principalmente na presença de oxigênio. Essa decomposição está relacionada com a presença de 5-hidroximetilfurfural (originado de ceto-hexoses) e furfural (originado principalmente de aldo-cetoses), produtos resultantes da degradação de açúcares pela oxidação do ácido ascórbico ou pela reação de Maillard. O produto dessas reações condensa-se ou reage com as antocianinas formando compostos de coloração marrom. Íons metálicos podem agir sobre as antocianinas complexando-as e deixando sua coloração voltada para o azul (MARKAKIS, 1982). A formação de complexos com as antocianinas em meio aquoso acontece também na presença de flavonóides não-antociânicos, ácidos orgânicos, ácidos nucléicos, proteínas, polissacarídeos, alcalóides e taninos por meio de copigmentação intermolecular, alterando a coloração do vermelho também para o azul (ASEN *et al.*, 1972).

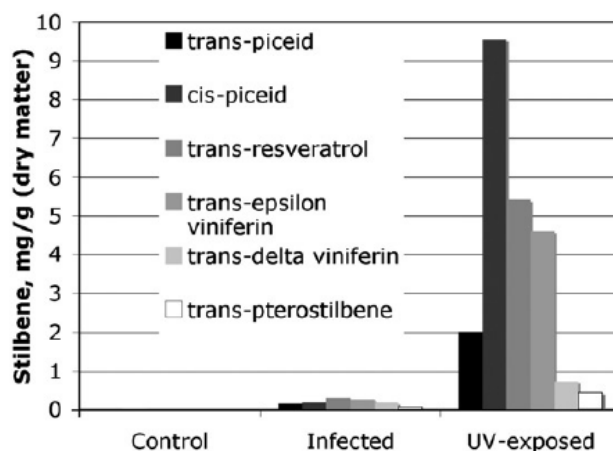
Por não existirem muitos compostos que absorvam na região das antocianinas (465 a 550 nm), a quantificação das mesmas é realizada por métodos espectrofotométricos baseados em medições simples de absorbância nos seus respectivos comprimentos de onda (WROLSTAD, 1976; JACKMAN & SMITH, 1996).

### 2.3.1.2. t-Resveratrol

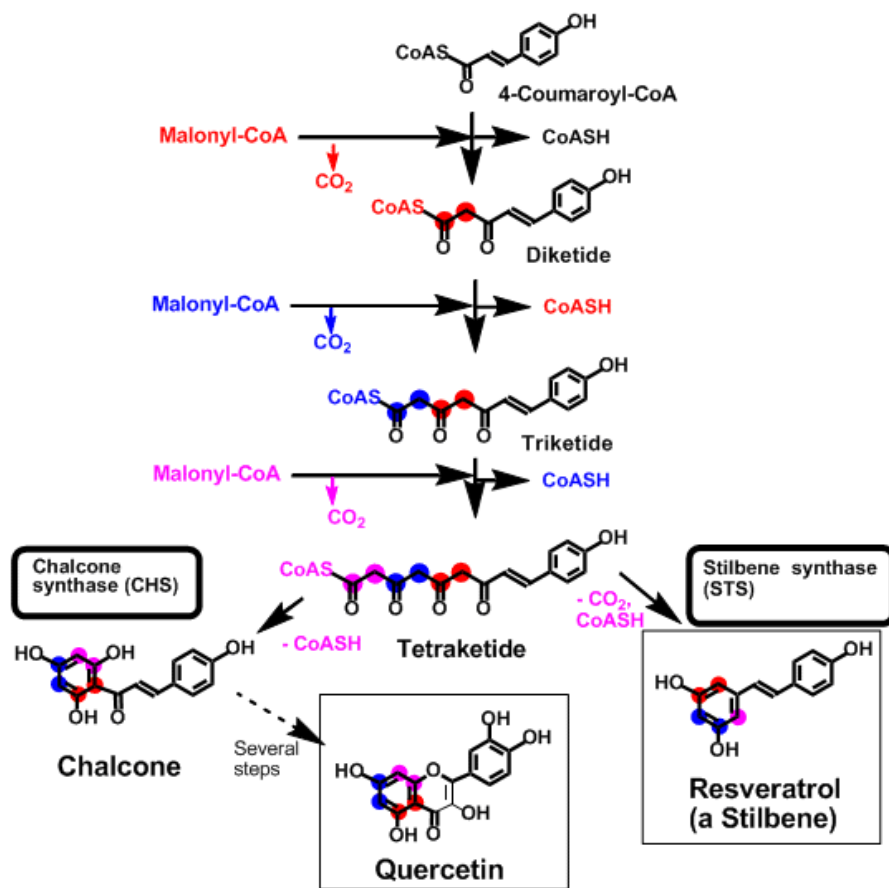
O t-resveratrol (3,4,4' – trans – trihidroxiestilbeno) é um polifenol não flavonóide pertencente à classe dos estilbenos e classificado como fitoalexina. As fitoalexinas são produzidas pela uva em resposta a agressões externas (processos mecânicos, fungos (*Botrytis cinérea*) ou mesmo pela ação de radiação ultravioleta). De acordo com relatos de ZHANG & BJÖRN (2009), envolvendo *Vitis vinifera* da variedade Cabernet Sauvignon, a estimulação por radiação UV-C propicia a geração de maiores quantidades de t-resveratrol, assim como de um conjunto de estilbenos e derivados, em relação à infecção provocada com *Plasmopara viticola* (Figura 3).

A concentração dos estilbenos nos vinhos varia de acordo com a variedade, a origem geográfica, o ataque de fungos e o processo de vinificação e conservação (SPINELLI *et al.*, 2006). O t-resveratrol ocorre naturalmente em várias espécies de plantas, porém as uvas e seus derivados representam uma importante fonte na dieta alimentar.

A biossíntese do t-resveratrol (Figura 4) deriva da rota do ácido chiquímico (que origina os fenilpropanóides, dentre eles a fenilalanina) e do acetato. Inicialmente ocorre a desaminação da fenilalanina pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL) para produzir ácido *trans*-cinâmico, o qual é então hidroxilado pela enzima cinamato-4-hidroxilase (C4H) para formar ácido *p*-coumárico. Esse produto é ligado à Coenzima A pela enzima 4-coumarato-CoA ligase (4CL). Na sequência, a enzima estilbeno sintase (STS) condensa *p*-coumaroil-CoA com três moléculas de malonil-CoA para formar o t-resveratrol (ZHANG *et al.*, 2006).



**FIGURA 3.** PRODUÇÃO DE t-RESVERATROL E OUTROS ESTILBENOS EM PLANTAS EXPOSTAS À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA EM COMPARAÇÃO COM PLANTAS INFECTADAS POR FUNGOS (FONTE: ZHANG & BJÖRN, 2009).



**FIGURA 4.** REPRESENTAÇÃO DA BIOSSÍNTESE DO t-RESVERATROL (ZHANG & BJÖRN, 2009).

O t-resveratrol é o único isômero encontrado nas uvas, sendo a forma cis encontrada somente nos vinhos após o processo de vinificação

O t-resveratrol vem sendo estudado na área da farmacologia devido à sua função antioxidante. Sua biodisponibilidade se dá em aproximadamente quinze minutos e seus metabólitos podem permanecer no sangue por aproximadamente nove horas. Porém, o consumo moderado permite obter um nível sérico de t-resveratrol apenas em concentrações micromolares. O t-resveratrol também é um importante candidato para a quimioprevenção de câncer devido à sua habilidade em bloquear alguns tipos de processos carcinogênicos, por meio da inibição de várias enzimas, como quinases, ciclo-oxygenases, ribonucleotídeos redutases e DNA polimerases. Além disso, o t-resveratrol protege o sistema cardiovascular através da proteção contra o dano de reperfusão isquêmica, promoção de vasorrelaxamento, proteção e manutenção do endotélio, propriedades antiateroscleróticas, inibição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e supressão de agregação plaquetária, desenvolvendo assim seu papel

de um ótimo preventivo contra doenças coronárias. Foram obtidos ainda dados promissores da utilização do t-resveratrol contra doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Huntington e Parkinson. Pelo fato de a neurotoxicidade estar relacionada à deficiência orgânica mitocondrial, tal condição pode ser melhorada pela inclusão de modificadores metabólicos e/ou antioxidantes (SAIKO *et al.*, 2008).

A atividade antioxidante do t-resveratrol está relacionada com sua estrutura química, especialmente o número e o arranjo dos grupos hidroxilas livres nos anéis aromáticos. Influem também o seu tamanho, massa e forma, assim como sua estereoquímica. Sua função “protetora” está relacionada com a doação de hidrogênios das hidroxilas para os radicais livres.

Os extratos de t-resveratrol geralmente são obtidos a partir de uma extração líquido/sólido seguida de uma retroevaporação até a obtenção de um extrato sólido ou uma solução (LANGCAKE & PRYCE, 1976; JEANDET *et al.*, 1991; SOUTO *et al.*, 2000; MARASCHIN *et al.*, 2003; AMARAL & CARO, 2005; ABE *et al.*, 2007). Esses extratos geralmente são quantificados por RMN (AMARAL & CARO, 2005), espectroscopia na região do infravermelho (MOLNÁR *et al.*, 2008) ou cromatografia em fase líquida de alta eficiência (JEANDET *et al.*, 1997; SOUTO *et al.*, 2000; ABE *et al.*, 2007; URPI-SARDA *et al.*, 2007).

#### **2.3.1.2.1. Efeito Quimioprotetor do t-Resveratrol**

Estudos mostram que o t-resveratrol é um dos mais potentes ativadores da SIRT1 (sirtuína 1). A SIRT1 pode aumentar a resistência ao estresse oxidativo de várias maneiras: estímulo de produção, secreção e número de receptores de antioxidantes, interação com moléculas que atuam em processos de estresse celular e aumento da função mitocondrial (BORDONE *et al.*, 2006; DELLA-MORTE *et al.*, 2009). A SIRT1 também interage com diversas moléculas que atuam em processos de dano celular, induzindo apoptose (morte celular programada) e inibindo a proliferação de células tumorais (ULRICH *et al.*, 2006; SAUNDERS & VERDIN, 2007; SHANKAR *et al.*, 2007; BISHAYEE & DHIR, 2009; DENG, 2009; LI *et al.*, 2009b). Além disso, o t-resveratrol apresenta efeito cardioprotetivo pela interação com SIRT1, enzimas vasodilatadoras e inibição de citocinas inflamatórias (DANZ *et al.*, 2009; MUKHERJEE *et al.*, 2009; NADERALI, 2009).

O t-resveratrol inibe a expressão e a atividade do canal iônico  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE-1), que, segundo estudos, está associado à carcinogênese. Desta forma, o t-resveratrol pode representar uma estratégia terapêutica ou mesmo uma ação quimiopreventiva do câncer (JHUMKA *et al.*, 2009).

Grandes quantidades de glicose e ácidos graxos provenientes da dieta podem induzir superprodução de espécies reativas de oxigênio mitocondrial devido ao aumento da oxidação. FEILLET-COUDRAY *et al.* (2009) demonstraram em estudo com camundongos que o extrato de polifenol obtido de vinho tinto (produzido na região de Languedoc-Roussillon) apresentou alguns efeitos protetivos contra estresse oxidativo induzido por dieta rica em açúcar e lipídios.

PALSAMY & SUBRAMANIAN (2009) realizaram um estudo com ratos diabéticos e verificaram que as enzimas chave no metabolismo da glicose foram normalizadas com o tratamento diário com t-resveratrol (5 mg/Kg/30 dias). O nível de glicose sanguínea e de hemoglobina glicosilada diminuiu e o nível de insulina plasmática aumentou, de tal maneira que o t-resveratrol tem potencial anti-hiperglicemiante e representa um promissor tratamento para o diabetes.

RIVERA *et al.* (2009), num estudo com ratos obesos e síndrome metabólica, concluíram que a administração diária de t-resveratrol (10 mg/Kg) reduz dislipidemias, resistência à insulina e hipertensão, além de redução do quadro inflamatório no tecido visceral adiposo.

KANG *et al.* (2009) verificaram que o t-resveratrol exerce um importante efeito regulatório nas reações inflamatórias através da inibição de fatores de ativação que induzem citocinas inflamatórias.

## 2.4. METODOLOGIAS ORIENTADAS À ANÁLISE DE VINHO

### 2.4.1. Índice de Cor (cor e tonalidade)

A quantificação dos índices de cor (Intensidade de cor e tonalidade) tem sido realizada por métodos espectrofotométricos, usualmente seguindo o procedimento descrito por AMERINE & OUGH (1988). Fundamentado em medições de absorvância em 420 nm, 520 nm e 620 nm, o método vem sendo utilizado para identificar características químicas e físicas nos vinhos, devido à grande quantidade de compostos que absorvem na região do visível, como antocianinas e seus derivados (URBANO *et al.*, 2006).

FREITAS (2000) avaliou a qualidade dos vinhos tintos de cultivares *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon, Merlot e Tannat das safras de 2003 e 2004, relacionando a cor e o teor de compostos fenólicos com as condições meteorológicas das regiões de Santana do Livramento e Bento Gonçalves, no Estado do Rio Grande do Sul.

### 2.4.2. Espécies Fenólicas e Capacidade Antioxidante

Os métodos mais comuns utilizados para quantificação da capacidade antioxidante são fundamentados na captura de radicais livres, produzidos a partir de ABTS (radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (RE *et al.*, 1999; KUSKOSKI



*et al.*, 2005), DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila) (MENSOR *et al.*, 2001) e DMPD (radical N,N-dimetil-p-fenilenodiamina) (FOGLIANO *et al.*, 1999).

O método ABTS tem sido extensivamente usado para avaliar a capacidade antioxidante de vinhos (LÓPEZ-VÉLEZ *et al.*, 2003; VILLANO *et al.*, 2004), bebidas e alimentos (BENAVENTE-GARCÍA *et al.*, 2000; VAN DEN BERG *et al.*, 2000) e fluidos biológicos (KIRSCHBAUM, 2001; MAZZA *et al.*, 2002).

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar a relação existente entre a atividade antioxidante e a concentração de polifenóis (SALAH *et al.*, 1995; CASTILLO *et al.*, 2000). VILLANO *et al.* (2004), por exemplo, verificaram que existe uma boa correlação entre o conteúdo de fenol total e o potencial antioxidante, sendo que o potencial antioxidante de vinhos tintos se apresenta 10 vezes maior que o de vinhos brancos, em função da maior concentração de fenóis.

LEE & RENNAKER (2007) determinaram a capacidade antioxidante e o conteúdo de estilbenos livres em amostras de quatro variedades de vinhos (Cabernet Sauvignon, Merlot, Riesling e Chardonnay). O estudo demonstra que a capacidade antioxidante e o nível de estilbenos variam consideravelmente com a variedade do vinho.

Vários métodos analíticos têm sido propostos para a determinação de polifenóis totais em vinhos. Em geral, os métodos mais práticos estão fundamentados na reação de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965).

Compostos fenólicos também podem ser determinados por HPLC (cromatografia em fase líquida de alta eficiência) (MAZZA *et al.*, 1999; RODRÍGUEZ-DELGADO *et al.*, 2002; IBERN-GÓMEZ *et al.*, 2002; POZO-BAYÓN *et al.*, 2003; ZAFRILLA *et al.*, 2003). Recentemente, métodos cromatográficos com detecção por espectrometria de massa têm sido usados para investigar a composição de amostras de vinho (REVILLA *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2000; HEIER *et al.*, 2002; MONAGAS *et al.*, 2005).

BRAVO *et al.* (2006), por exemplo, usaram cromatografia em fase líquida associada com espectrometria de massa e detectores de arranjo de diodo, de fluorescência e eletroquímicos para estudar a composição fenólica de vinhos suaves da região de Setúbal (Portugal). Diferentes composições fenólicas e diferentes conteúdos de fenóis totais foram encontrados nas amostras analisadas, identificando-se alguns ácidos fenólicos, estilbenos e flavonóides.

Segundo FREITAS (2000), os vinhos tintos no Brasil, da região de Bento Gonçalves, têm a concentração de polifenóis totais entre 491,4 a 1722,3 mg L<sup>-1</sup> para vinhos da cultivar Cabernet, entre 430,3 a 1992,6 mg L<sup>-1</sup> para vinhos da cultivar Merlot e 832,9 a 1932,9 mg L<sup>-1</sup> para vinhos da cultivar Tannat.

GARCÍA-FALCÓN *et al.* (2007) usaram vários métodos analíticos baseados em cromatografia líquida para determinação de 38 compostos fenólicos em vinhos tintos. As

antocianinas e ácido hidroxicinâmico foram determinados por injeção direta das amostras de vinho, enquanto que a determinação de ácido hidroxibenzóico, catequinas, procianidinas e flavanóides foi precedida de extração líquido/líquido seguida de extração em fase sólida.

#### 2.4.3. t-Resveratrol

Usualmente, a determinação de t-resveratrol é propiciada por uma extração líquido/líquido preliminar, seguida de rota-evaporação até obtenção de um resíduo sólido (ABE *et al.*, 2007; SOUTO *et al.*, 2000; MARASCHIN *et al.*, 2000; AMARAL & CARO, 2005; LANGCAKE & PRYCE, 1976; JEANDET *et al.*, 1991). Após dissolução, os extratos sólidos podem então ser analisados por cromatografia líquida (SOUTO *et al.*, 2000; MARASCHIN *et al.*, 2003; URPI-SARDA *et al.*, 2007), espectrometria de ressonância magnética nuclear (AMARAL & CARO, 2005) ou espectroscopia na região do infravermelho (MOLNÁR *et al.*, 2008).

Alguns artigos têm sido publicados avaliando o conteúdo de *cis* e *trans*-resveratrol em vinhos produzidos por diferentes variedades de uvas (GOLDBERG *et al.*, 1995; RODRÍGUEZ-DELGADO *et al.*, 2002). Segundo SOUTO *et al.* (2001), vinhos de diversos países apresentaram valores médios de t-resveratrol de 0,77 mg L<sup>-1</sup> (Canadá), 0,998 mg L<sup>-1</sup> (EUA), 0,873 mg L<sup>-1</sup> (Grécia), 0,157 mg L<sup>-1</sup> (Japão), 1,00 mg L<sup>-1</sup> (Portugal), 1,21 mg L<sup>-1</sup> (Chile e Argentina).

No Brasil existem poucos estudos sobre o conteúdo de t-resveratrol em vinhos. SOUTO *et al.* (2001) indicam valores médios da ordem de 1,8 mg L<sup>-1</sup>, para vinhos Cabernet Sauvignon produzidos na região Sul do País.

SEFERIN *et al.* (2001) verificaram que as concentrações de t-resveratrol em vinhos Merlot vêm aumentando nas últimas safras, de maneira similar ao observado para o varietal Cabernet Sauvignon. Tais diferenças foram atribuídas às condições climáticas diferenciadas para cada safra, assim como diferentes pressões por fungos sobre as diversas colheitas.

#### 2.5. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO (FTIR)

Nos últimos anos, a espectroscopia na região do infravermelho tem servido de base para a caracterização de inúmeras propriedades físico-químicas de interesse, incluindo amostras de vinhos. Estudos mostram que espectros na região do infravermelho podem ser utilizados para determinar propriedades como atividade antioxidante (VERSARI *et al.*, 2010), quantificar espécies químicas como antocianinas (SORIANO *et al.*, 2007) e diferenciar diversas espécies de uvas (TARANTILIS *et al.*,

2008), principalmente recorrendo-se à região espectral compreendida entre 1500 e 900  $\text{cm}^{-1}$ , que é característica de vinhos.

Métodos fundamentados em espectroscopia na região do infravermelho vêm sendo utilizados com êxito em determinações de compostos fenólicos em amostras de vinho (VONACH *et al.*, 1998; COZZOLINO *et al.*, 2003; NIEUWOUDT *et al.*, 2006). Recentemente, a técnica tem permitido a avaliação de macroconstituintes, oferecendo vantagens associadas à sua versatilidade, eficiência, baixo custo efetivo, rapidez e caráter não destrutivo (CAVINATO *et al.*, 1990; GALLIGNANI *et al.*, 1994; HERRERA *et al.*, 2003).

Mais recentemente, métodos espectroscópicos associados a ferramentas quimiométricas têm permitido a determinação simultânea de parâmetros de relevância em amostras de vinho, destacando o teor de álcool e de fenóis totais (PATZ *et al.*, 2004). A primeira aplicação de métodos espectroscópicos associados a técnicas quimiométricas para análise de vinhos foi relatada por SCHINDLER *et al.*, (1998), enquanto que importantes estudos que comparam a espectroscopia multivariada com os métodos convencionais de referência foram reportados por PATZ *et al.*, (1999).

### **3. OBJETIVOS**

---

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

O principal objetivo deste trabalho consiste em desenvolver metodologias de análise para a caracterização das propriedades antioxidantes de vinho.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estabelecimento de metodologias de análise para a determinação de t-resveratrol em amostras de vinho, utilizando-se cromatografia em fase líquida de alta eficiência.
- Caracterização das propriedades antioxidantes de amostras de vinho (atividade antioxidante e teor de fenóis totais), utilizando-se técnicas espectrofotométricas convencionais.
- Desenvolvimento de modelos multivariados fundamentados em espectroscopia eletrônica e na região do infravermelho, para determinação da atividade antioxidante e do teor de fenóis totais em amostras de vinho.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1. AMOSTRAS

As amostras de vinho foram obtidas em supermercados, distribuidoras de bebidas e adegas. Algumas amostras foram doadas pelas vinícolas Miolo, Garibaldi e Campo Largo. Foram analisadas 47 amostras de vinhos oriundos de diversas vinícolas, safras e países. A cada amostra de vinho foi atribuído um código descrito na Tabela 1.

### 4.2. REAGENTES

Determinações de atividade antioxidante envolveram o uso de ABTS (2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico, Sigma), persulfato de potássio (Acros Organics) e Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico, Sigma) com 97% de pureza.

Determinações de fenóis totais envolveram o uso de Ácido Gálico (Vetec), Carbonato de sódio (Vetec) e Reagente de Folin-Ciocalteu (Polipur.), que corresponde, basicamente, a uma mistura de Tungstato e molibdato de sódio

Determinações de t-resveratrol envolveram o uso de t-resveratrol (Sigma) com 99% de pureza e solventes de grau cromatográfico de pureza (ex. acetona e acetato de etila).

Outros reagentes foram de grau P.A. de pureza.

### 4.3. EQUIPAMENTOS

Espectros na região do UV-VIS foram registrados num espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-2401PC, empregando cela de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm com leitura de comprimentos de onda entre 200 e 800 nm.

Os espectros refletância total atenuada na região do infravermelho médio (ATR/FTIR) foram adquiridos na faixa de 4.000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 varreduras, utilizando um acessório de refletância total atenuada com cristal de seleneto de zinco (ZnSe) acoplado a um espectrofotômetro de leitura na região do infravermelho com transformada de Fourier Bio-Rad da série Excalibur, FTS 3500GX; equipado com “beamsplitter” de KBr; detector de Sulfeto de triglicerina deuterada (DTGS); fonte de radiação de carbeto de silício .

Determinações cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência Waters, equipado com detector de arranjo de fotodiodos. As medidas foram realizadas empregando-se coluna C18 (Waters, 4,6 x 150 mm, partícula de 5  $\mu\text{m}$ ).

**TABELA 1.** DESCRIÇÃO DAS VINÍCOLAS, TIPO DE UVA, SAFRAS E ORIGEM DOS VINHOS ANALISADOS.

<b>Amostra</b>	<b>Nome</b>	<b>Uva</b>	<b>Ano</b>	<b>Nacionalidade</b>
A01	Do Avô	Mistura	2006	Brasil
A02	Carta Nueva	Cabernet Sauvignon	2008	Chile
A03	Diego del Valle	Carmenere	2000	Chile
A04	Franco Italiano	Mistura - Colonial	2008	Colombo-Brasil
A05	Salton Classic	Merlot	2007	Brasil
A06	Aurora Varietal	Pinot Noir	2008	Brasil
A07	Chalet Du Clermont	Mistura	2005	Brasil
A08	Acquasantiera	Cabernet Sauvignon	2005	Brasil
A09	Santa Carolina - Reservado	Cabernet Sauvignon	2007	Chile
A10	Miolo (Campos de Cima)	Merlot	2008	Brasil
A11	Miolo (Campanha Gaucha)	Merlot	2008	Brasil
A12	Santa Florentina	Malbec	2007	Argentina
A13	Santa Helena	Cabernet Sauvignon	2007	Chile
A14	Santa Florentina	Cabernet Sauvignon	2007	Argentina
A15	Miolo (Vale dos Vinhedos)	Merlot	2008	Brasil
A16	Saint Germain	Merlot	2008	Brasil
A17	Vinãs de Alvear	Malbec	2008	Argentina
A18	Da Casa - Garibaldi	Isabel e Bordo	2008	Brasil
A19	Marcus James	Tannat	2008	Brasil
A20	Trapiche	Malbec	2007	Argentina
A21	Etchart	Malbec	2006	Argentina
A22	Meridien 68	Cabernet Sauvignon	2008	Argentina
A23	Caballo Negro	Carmenere	2007	Chile
A24	Trimento Tribu	Pinot Noir	2007	Chile
A25	Santa Helena	Malbec	2007	Argentina
A26	Trivento Tribu	Tempranillo	2007	Argentina
A27	Evolucion	Merlot	2006	Chile
A28	Solar del Paso	Tannat	2007	Uruguai
A29	Caballo de Oro	Syrah	2005	Chile
A30	Vaporo 1888	Cabernet Sauvignon	2005	Brasil
A31	Baccio	Cabernet Sauvignon	2006	Brasil
A32	Trapiche	Merlot	2007	Argentina
A33	Leonardo Falcone	Tannat	2004	Uruguai
A34	Carta Vieja	Cabernet Sauvignon	2007	Chile
A35	Norton	Bonarda	2006	Argentina
A36	Terrasul	Cabernet Sauvignon	2004	Brasil
A37	Norton	Barbera	2007	Argentina
A38	Colina del Vale	Mistura	2008	Brasil
A39	Terranova	Shiraz	2006	Brasil
A40	Trapiche	Malbec	2008	Argentina
A41	Espirito de Chile	Carmenere	2007	Chile
A42	Castilo de Liria	Bobal & Shiraz	2005	Espanha
A43	Latitud 33	Syrah	2007	Argentina
A44	Santa Helena	Malbec	2007	Chileno
A45	Veneto	Merlot	2006	Itália
A46	Calvet	Merlot	2005	França
A47	Obikwa	Shiraz	2006	Africa do Sul

#### 4.4. METODOLOGIAS

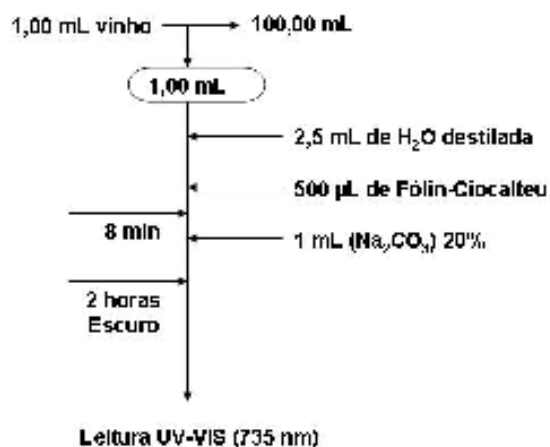
##### 4.4.1. Determinação de Fenóis Totais

A determinação do conteúdo de fenóis totais nas amostras em estudo foi realizada conforme o método descrito por SINGLETON & ROSSI (1965), utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu. A determinação na região do UV-VIS foi feita num espectrofotômetro Shimadzu modelo UV 2401PC, empregando uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Em meio alcalino, compostos de natureza fenólica reduzem os ácidos fosfomolibdico e fosfotungstístico do reagente de Folin, com formação de complexos de coloração azul que absorvem fortemente entre 620 e 700 nm (IKAWA *et al.*, 2003; NACZK & SHAHIDI, 2004).

O vinho (1,00 mL) foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 100,0 mL e o volume final foi completado com água destilada. Uma alíquota de 1,00 mL desta solução foi agitada com 500  $\mu$ L do reagente de Folin-Ciocalteu e 2,5 mL de água destilada por 8 minutos. Passado esse tempo, 1,0 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20% m/v foi adicionado à mistura, a qual foi agitada por 30 segundos. A mistura foi mantida em local escuro durante 2 horas e a absorvância das amostras foi medida em 760 nm (Figura 5).

Curvas analíticas foram elaboradas entre 0,25 e 2,50 g L<sup>-1</sup>, utilizando-se solução padrão de ácido gálico. Devido à heterogeneidade estrutural dos compostos fenólicos, os resultados foram expressos em gramas de equivalentes de ácido gálico (BLANCO *et al.*, 1998).



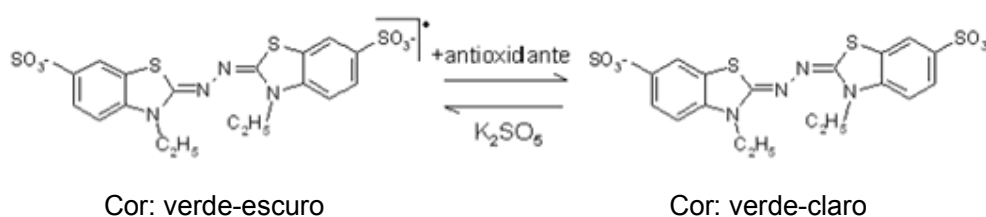
**FIGURA 5.** ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROCEDIMENTO UTILIZADO NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS.

#### 4.4.2. Determinação da Atividade Antioxidante

A determinação da atividade antioxidante foi realizada por espectroscopia na região do visível, utilizando-se o método ABTS (2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico). Os resultados são representados pela atividade antioxidante equivalente de Trolox (em inglês, Trolox equivalent antioxidant activity - TEAC), que corresponde a um antioxidante análogo à vitamina E.

O radical  $ABTS^{\cdot+}$  pode ser gerado por reação com persulfato, de acordo com a reação apresentada na Figura 6 (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

O radical  $ABTS^{\cdot+}$  foi preparado a partir da reação de 5,0 mL da solução estoque de ABTS (7 miliM) com 88  $\mu$ L da solução de persulfato de potássio (140 miliM). A mistura foi mantida no escuro, a temperatura ambiente e durante 18 horas, e posteriormente diluída em álcool etílico até se obter uma absorbância de  $0,80 \pm 0,05$ , em 734 nm.



**FIGURA 6.** ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL  $ABTS^{\cdot+}$  POR UM ANTIOXIDANTE E SUA FORMAÇÃO PELO PERSULFATO DE POTÁSSIO.

A calibração da metodologia foi realizada com solução etanólica de Trolox (2 miliM), em concentração entre 100  $\mu$ M e 2000  $\mu$ M. Em ambiente escuro, foram transferidas alíquotas de 30  $\mu$ L de cada solução de Trolox (100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M, 1500  $\mu$ M e 2000  $\mu$ M) para tubos de ensaio, misturando-se com 3,0 mL da solução do radical  $ABTS^{\cdot+}$ , agitando-se durante 20 segundos. Após 6 min, a leitura foi realizada em 734 nm.

De cada amostra de vinho foram transferidos 2,0 mL para um balão volumétrico de 10,0 mL, o qual foi completado com água destilada. Ao abrigo da luz, foram retirados 30  $\mu$ L dessa solução e transferidos para um tubo de ensaio contendo 3,0 mL de uma solução do radical  $ABTS^{\cdot+}$ . Esperou-se 6 minutos e procedeu-se à leitura em espectrofotômetro UV-VIS a 734 nm. Após o tempo de reação, observou-se um processo de descoloração da solução, que passou da cor verde-escura para coloração verde-clara.



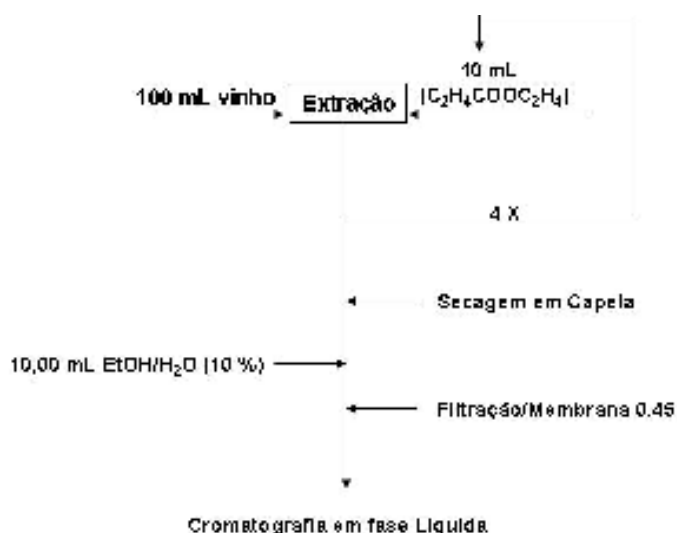
#### 4.4.3. Determinação de t-Resveratrol por HPLC

Para todas as determinações quantitativas por HPLC foi construída uma curva analítica com o padrão de t-resveratrol, nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 mg/L, a partir de uma solução estoque de 10 mg/L. A escolha desse intervalo de concentrações se deu em função da média de t-resveratrol em vinhos brasileiros, que é de 1,78 mg/L (SOUTO *et al.*, 2001).

Para obtenção das amostras para injeção em HPLC foram realizadas 4 extrações para cada amostra de vinho. A extração foi realizada em um funil de separação de 250,0 mL, onde foram colocados 100,0 mL de cada amostra de vinho e volumes de 10,0 mL de acetato de etila. Após as 4 extrações, o volume orgânico recuperado foi submetido à secagem em capela. Ao resíduo foram adicionados 10,0 mL de uma solução (90/10 v/v) de água destilada/álcool etílico. A solução foi filtrada com membranas de nitrato de celulose (Millipore®) 0,45 µm e injetadas com uma vazão de 1mL/min no HPLC para identificação do t-resveratrol (Figura 7).

A eluição por gradiente envolveu misturas metanol/ácido acético/água, nas proporções 10:2:8 (Fase A) e 90:2:8 (Fase B). A eluição seguiu a programação indicada a seguir:

1. Fase A, partindo de 100% até 85% nos 15 primeiros minutos.
2. Fase A partindo de 85% até 50% nos próximos 10 minutos.
3. Fase A partindo de 50% até 30% nos próximos 9 minutos.
4. Fase A partindo de 30% a 0% nos próximos 11 minutos.



**FIGURA 7.** ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROCEDIMENTO UTILIZADO NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE t-RESVERATROL.

#### 4.4.4. Caracterização por Espectroscopia na Região do UV-Vis

A determinação do Índice de cor (IC) foi realizada segundo GLORIES (1984), utilizando as medidas de absorvâncias em comprimentos de onda específicos (420 nm, 520 nm e 620 nm). Com o auxílio de pipeta automática, transferiu-se quantitativamente 1,00 mL de amostra de vinho para um balão volumétrico de 10,00 ml e completou-se com água destilada. As soluções permaneceram em repouso durante quinze minutos, ao abrigo da luz. Calculou-se o IC a partir da soma das absorvâncias nos comprimentos de onda de 420 nm, 520 nm e 620 nm.

A medida de tonalidade (T) foi obtida através do quociente das absorvâncias de 420 e 520 nm.

#### 4.4.5. Caracterização por Espectrometria na Região do Infravermelho Médio

Os espectros de refletância total atenuada na região do infravermelho médio (ATR/FTIR) foram adquiridos na faixa de 4.00 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e acumulando 128 varreduras.

Amostras de vinho foram colocadas diretamente no acessório de ATR, constituído de um cristal de seleneto de zinco (Figura 8).



**FIGURA 8.** ACESSÓRIO PARA MEDIDAS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA.

#### 4.4.6. Estudos Quimiométricos

As análises de Componentes Principais (PCA) e Análise de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) foram executadas em ambiente Matlab (versão 6.5, utilizando o pacote PLS-toolbox versão 3.0).

Para construção dos modelos de calibração multivariada (PLS) foram utilizados os dados espectrais obtidos na região do infravermelho médio por ATR e na região do visível (vetor X), os quais foram correlacionados com a concentração de t-resveratrol, fenóis totais e atividade antioxidante (vetores Y), parâmetros estes obtidos pelos métodos

de referência. Diversos sistemas de pré-processamento de sinais foram avaliados, dentre os quais se destacam: dados centrados na média, alisamento (média móvel, para melhorar a razão sinal-ruído) e derivação (para a correção de deslocamento de linha de base e melhorar o sinal de bandas sobrepostas).

O conjunto total de espectros foi dividido em dois subconjuntos: um de calibração e outro de validação externa, este último composto pelas amostras: A3, A16, A29, A37 e A44. O número de variáveis latentes empregados nos modelos foi determinado a partir da análise dos valores do erro na etapa de validação cruzada (RMSECV, *root mean square error of cross validation*, Equação 1), realizada por uma rotina de “leave-one-out”.

A habilidade de previsão dos modelos de calibração foi avaliada através dos erros de previsão (RMSEP), associados ao conjunto de calibração (validação cruzada) e ao conjunto de validação externa.

$$\text{RMSECV} = \text{RMSECP} [\Sigma(y_{\text{predito}} - y_{\text{referência}})^2 / n]^{1/2} \quad (1)$$

Onde:  $n$  é o número de amostras,  $y_{\text{referência}}$  são os valores determinados pelo método de referência e  $y_{\text{previsto}}$  são os valores previstos pelo modelo PLS.

Foram calculados também os erros relativos percentuais para cada amostra usada na etapa de validação, usando a expressão apresentada na Equação 2:

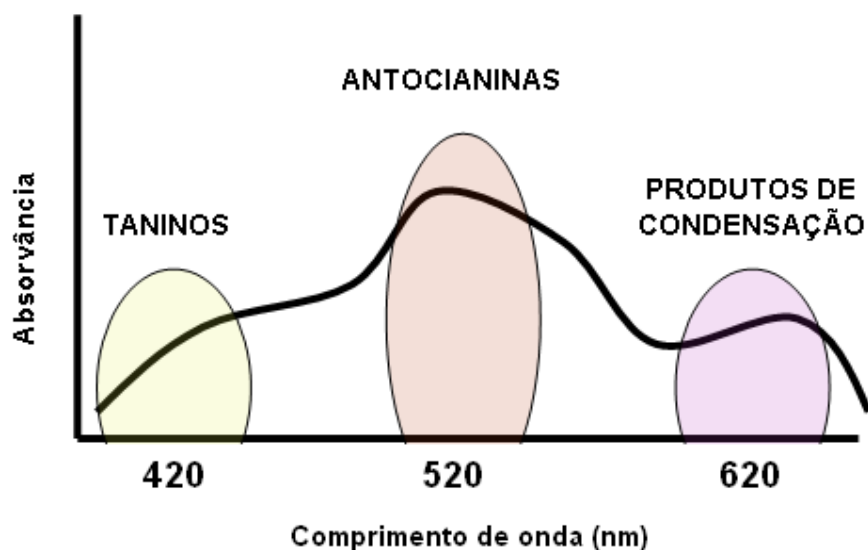
$$\text{ER (\%)} = (Y_{\text{previsto}} - Y_{\text{referência}}) / Y_{\text{referência}} \times 100 \quad (2)$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. INTENSIDADE DE COR (IC) E TONALIDADE (T)

A intensidade e a tonalidade da cor se relacionam diretamente com a composição do vinho tinto, principalmente no que diz respeito a compostos fenólicos, sendo que, em geral, a maior quantidade de fenóis totais está associada à presença de cascas e sementes em algumas etapas da produção do vinho.

Dentre o grupo de fenóis encontrados no vinho, destaque pode ser dado aos taninos e às antocianinas, os quais correspondem a pigmentos hidrossolúveis que permitem colorações que vão do vermelho ao azul. Em geral, a intensidade da cor associada à presença destas espécies é avaliada pelo somatório das absorvâncias registradas em 420, 520 e 620 nm, enquanto que a tonalidade, que é uma função da presença de antocianinas, é avaliada pelo valor do quociente entre as absorvâncias em 420 e 520 nm ( $420/520$ ). De maneira geral, estima-se que os valores de absorvância registrados em 420 nm podem ser atribuídos a tanino, a taninos condensados e à combinação de taninos com antocianinas, enquanto que os valores observados em 520 nm se correlacionam com a cor avermelhada das antocianinas. Por sua vez, a absorvância registrada em 620 nm indica tendência de cores violeta e azul, o que pode ser correlacionado com a presença de produtos de condensação entre catequinas e antocianinas (Figura 9).



**FIGURA 9.** REGIÕES DO ESPECTRO VISÍVEL RELACIONADAS À ABSORÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E SEUS DERIVADOS RESPONSÁVEIS PELA COR EM VINHOS TINTOS.

Desta forma, elevados índices de cor implicam em maior concentração de taninos e antocianinas, enquanto que elevadas tonalidades indicam uma menor concentração de antocianinas.

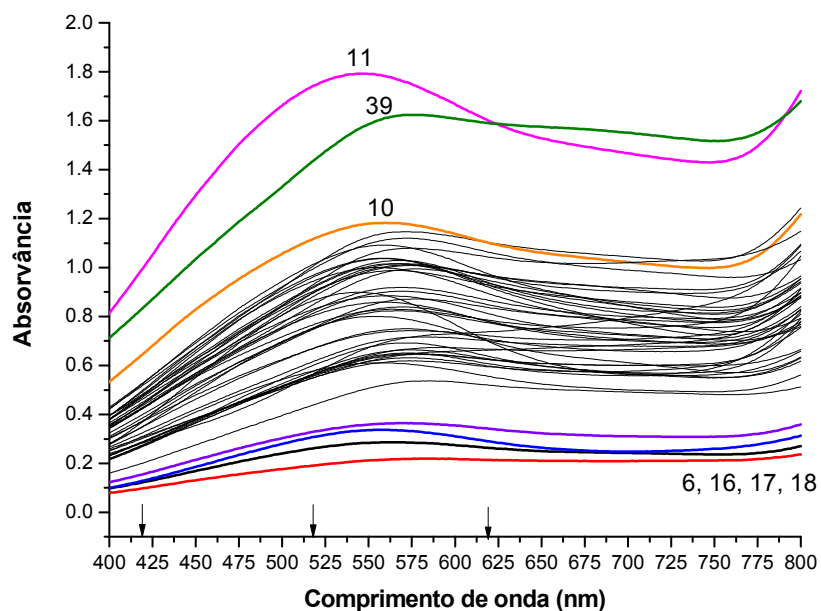
Segundo HASLAM (1980), reações que acontecem durante a maturação do vinho provocam uma diminuição no teor de antocianinas, o que resulta em modificações características na coloração do vinho, podendo ir da violácea ao marrom (violácea, púrpura, granada, cereja, rubi, telha, castanho e marrom). Desta forma, vinhos “jovens” apresentam coloração vermelho-azulada, enquanto que vinhos “maduros” se caracterizam por uma coloração marrom-avermelhada. Assim, algumas reações características podem ser evidenciadas por modificações no espectro de absorção, dentre as quais é possível destacar:

1. A polimerização das antocianinas aumenta a absorção em 420 nm;
2. A oxidação das antocianinas diminui a absorção em 520 nm e 620 nm;
3. Taninos polimerizados escurecem, aumentando a absorção em 420 nm;
4. Combinações entre taninos e antocianinas durante a vinificação aumentam a absorção em 420 nm e diminuem a absorção em 620 nm;
5. Flavonas polimerizadas incolores oxidam e aumentam a absorção em 520nm.

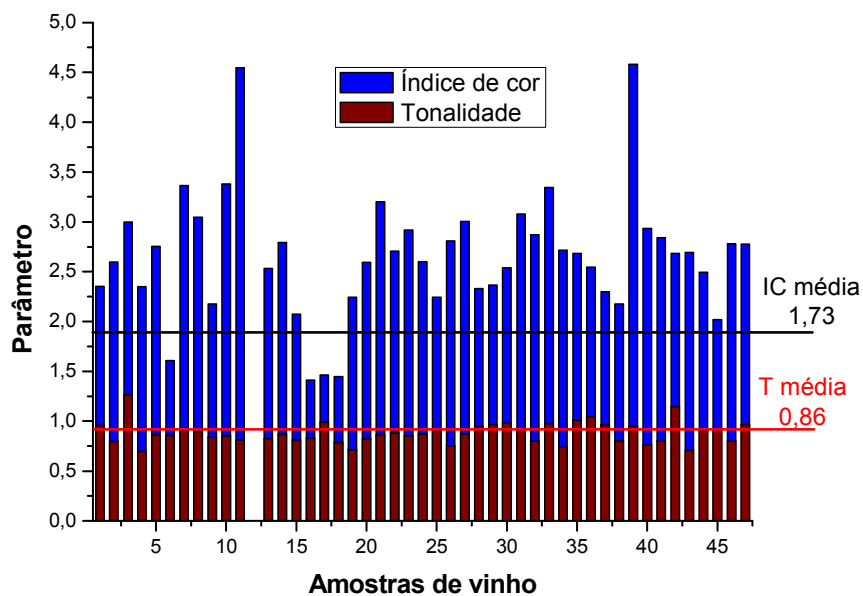
Mesmo que a relação antes citada seja bem conhecida, existe certa dificuldade na caracterização de vinhos recorrendo-se exclusivamente a medidas de absorvância nestes comprimentos de onda, ou aos parâmetros de índice de cor e tonalidade, principalmente em razão da presença de inúmeras espécies químicas que apresentam absorção intermediária.

Nos espectros apresentados na Figura 10 é possível verificar perfis similares para grande parte das amostras, assim como amostras de elevada (10, 11 e 39) e baixa (6, 16, 17 e 18) absorção na região monitorada.

A partir dos parâmetros de índice de cor (Figura 11) é possível observar que as amostras 6, 16, 17 e 18 apresentaram baixa intensidade de absorção nos comprimentos de onda monitorados, o que sugere tratar-se de vinhos maduros. Diferentemente, as amostras 10, 11 e 39 apresentaram altos valores de IC, o que sugere vinhos jovens.



**FIGURA 10.** ESPECTROS ELETRÔNICOS (400-800 nm) DAS AMOSTRAS DE VINHO ANALISADAS.



**FIGURA 11.** REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS VALORES DE ÍNDICE DE COR ( $IC = Ab. 420 \text{ nm} + Ab. 520 \text{ nm} + Ab. 620 \text{ nm}$ ) E DE TONALIDADE ( $T = Ab. 420 \text{ nm} / Ab. 520 \text{ nm}$ ) NAS AMOSTRAS DE VINHO ANALISADAS. OS VALORES DE IC E T PARA A AMOSTRA 12 NÃO FORAM APRESENTADOS.

Tal como comentado anteriormente, a caracterização de vinhos ou a classificação por safras não pode ser convenientemente realizada levando-se em consideração os valores de absorção em comprimentos de onda característicos, em função da interferência provocada pelas inúmeras espécies químicas presentes no vinho. Assim, as amostras 10 e 11, inicialmente consideradas como sendo de vinhos jovens, são da mesma safra das amostras 6, 16, 17 e 18, consideradas previamente como vinhos maduros.

Segundo FREITAS (2006), os vinhos envelhecem de maneira diferenciada, dependendo da origem, produção, manuseio e armazenamento. Provavelmente, as amostras que compõem o nosso universo amostral foram submetidas a diferentes condições de armazenamento, o que, dentre outras coisas, provoca graus de maturação que independem da safra.

#### **5.1.1. Análise de Componentes Principais (PCA)**

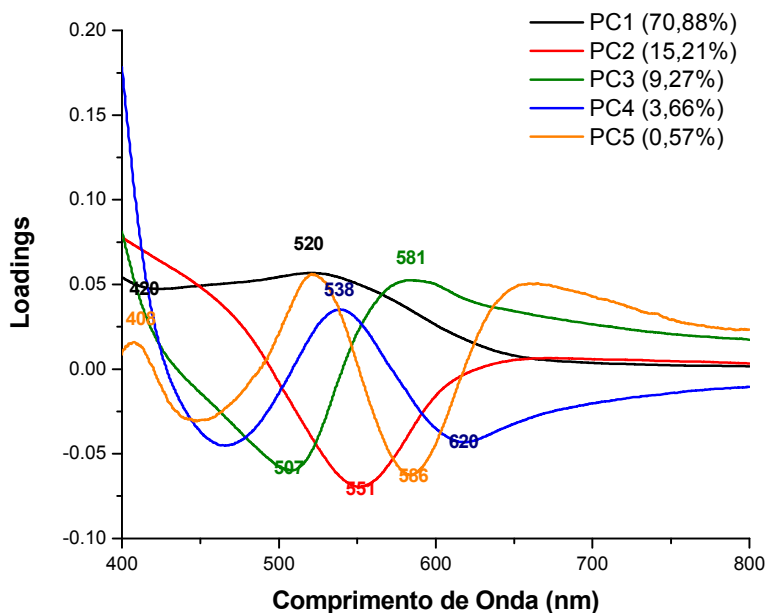
A análise de componentes principais (PCA) corresponde a um dos métodos quimiométricos mais frequentemente utilizados para interpretação de dados multivariados. Nesse método, as variáveis originais são representadas por novas variáveis não correlacionadas, denominadas componentes principais (CPs), que são combinações lineares das variáveis originais e explicam a maior parte da variância, permitindo simplificação na visualização dos dados.

Neste trabalho, os dados espectrais das amostras de vinho foram processados por uma rotina de PCA, objetivando verificar a existência de semelhanças e diferenças que pudessem ser correlacionadas com a safra ou com o grau de maturidade dos vinhos, dentre outras características (varietal, origem, etc.)

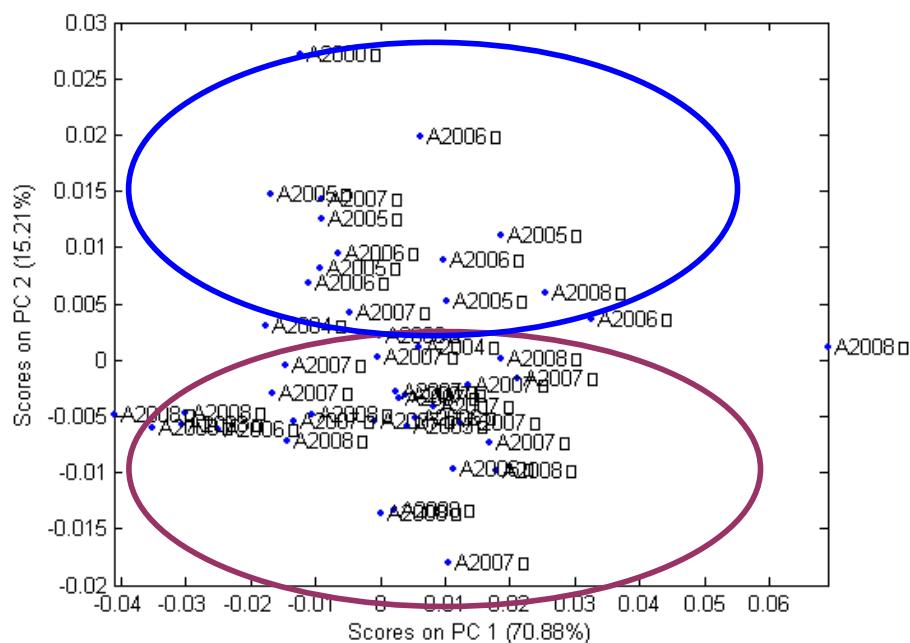
O processamento dos dados espectrais (400-800 nm) centrados na média permitiu verificar que duas CPs são capazes de representar aproximadamente 94% da variância dos dados espectrais. O gráfico de *loadings* (pesos) apresentado na Figura 12 demonstra que as cinco primeiras componentes principais representam informações espectrais diferenciadas, cada uma das quais, centrada em diferentes regiões espectrais.

No gráfico de escores (Figura 13) é possível observar certa distinção entre as amostras de vinhos mais “maduros” (safra de 2000, 2004, 2005 e 2006) e vinhos mais “novos” (safra de 2007 e 2008), diferenciação esta que é viabilizada pela segunda componente principal. Uma vez que o gráfico de *loadings* para a segunda CP (Figura 11) mostra grande relevância da região espectral centrada em 550 nm, é possível assumir que a diferenciação observada é uma função da presença de produtos de condensação entre antocianinas e catequinas. Alterações químicas na composição do vinho que

interferem nessa estabilidade e em suas absorções podem estar relacionadas a diversos fatores como: armazenamento, temperatura, luz, presença de oxigênio, tipo de uva, processos de fermentação entre outros.



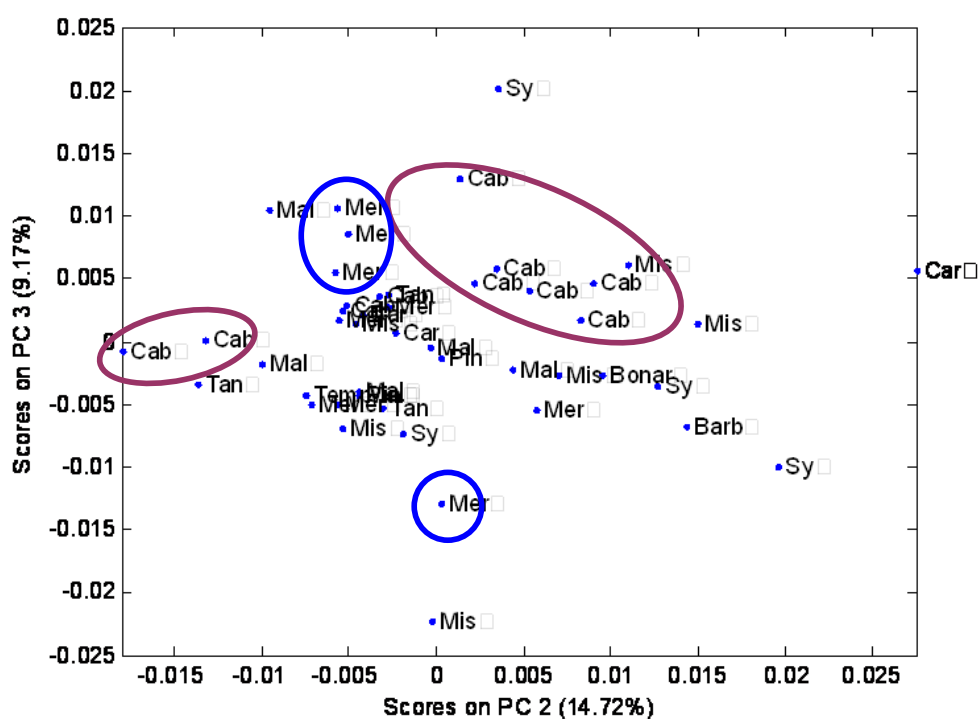
**FIGURA 12.** GRÁFICO DE PESOS DAS CINCO PRIMEIRAS COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) NA ANÁLISE DE DADOS DE ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA.



**FIGURA 13.** GRÁFICO DE SCORES DAS DUAS PRIMEIRAS COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1 E CP2) NA ANÁLISE DE DADOS DE ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA.



Utilizando-se outras componentes principais (Figura 14) é possível observar alguns agrupamentos envolvendo vinhos do mesmo varietal. Neste caso, o critério não corresponde apenas aos comprimentos de onda usualmente utilizados para avaliar índice de cor e tonalidade (420, 520 e 620 nm), mas todas as regiões espectrais indicadas no gráfico de pesos apresentado na Figura 10. Novamente, a existência de amostras de um mesmo varietal classificadas em regiões diferentes (ver Figura 14), indica que a informação espectral monitorada não reúne todos os argumentos necessários para uma adequada diferenciação dos vinhos.



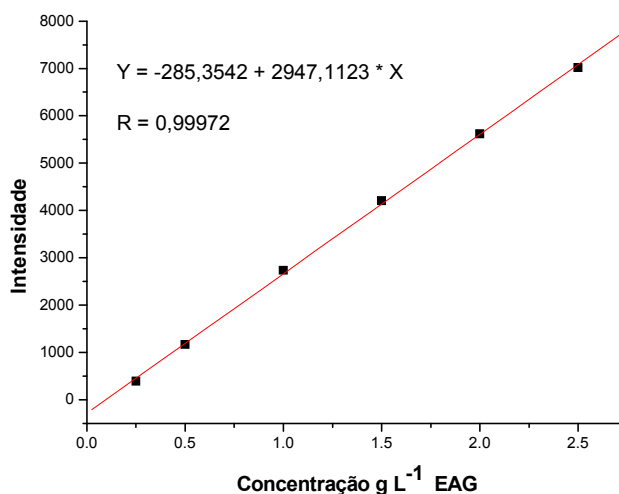
**FIGURA 14.** GRÁFICO DE SCORES (PC2 e PC3) NA ANÁLISE DE DADOS DE ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA (Barb: Barbera, Car: Carmenere, Sy: Syraz, Tan: Tannat, Cab: Cabernet Sauvignon, Mer: Merlot, Mis: Mistura de uvas, Mal: Malbec, Pin: Pinot Noir).

## 5.2. DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS

A determinação do teor de fenóis totais foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível, utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965). O método se fundamenta na redução do reagente de Folin-Ciocalteu, que contém uma mistura de ácidos fosfomolibdico e fosfotungstístico, com formação de um complexo de coloração azul intensa com absorção máxima entre 620 e 725 nm. O

método permite a quantificação de espécies fenólicas, mas pode sofrer interferências de outras substâncias redutoras de natureza não-fenólica (IKAWA *et al.*, 2003; NACZK & SHAHIDI, 2004).

A curva analítica, preparada entre 0,5 e 2,5 g L<sup>-1</sup> de ácido gálico, se mostrou bastante linear, com coeficiente de regressão de 0,9991 (Figura 15).



**FIGURA 15.** CURVA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU.

Inicialmente, a precisão da metodologia foi avaliada por análise em quintuplicata de uma amostra de vinho, obtendo-se os resultados que são apresentados na Tabela 2. Adicionalmente, outros estudos de repetibilidade foram realizados por análise em triplicata de sete amostras de vinho (resultados não apresentados devido a diversidade de replicata das amostras (duplicatas, triplicatas, quintuplicatas). Em todos estes estudos foram observados desvios padrão relativos da ordem de 3%, o que demonstra uma boa precisão da metodologia utilizada.

Os resultados da concentração de fenóis totais obtidos na análise das 47 amostras de vinho são apresentados na Figura 16. Para uma melhor visualização, os resultados são também apresentados na forma de um “box-chart” na Figura 16. O teor de fenóis totais variou entre 0,97 e 2,91 g L<sup>-1</sup>, com média em torno de 1,91 g L<sup>-1</sup>. Avaliações estatísticas (teste t) indicaram uma variação significativa do teor de fenóis totais dentro do conjunto amostral, o que fica claramente evidenciado comparando-se, por exemplo, os resultados das amostras 11 e 45.

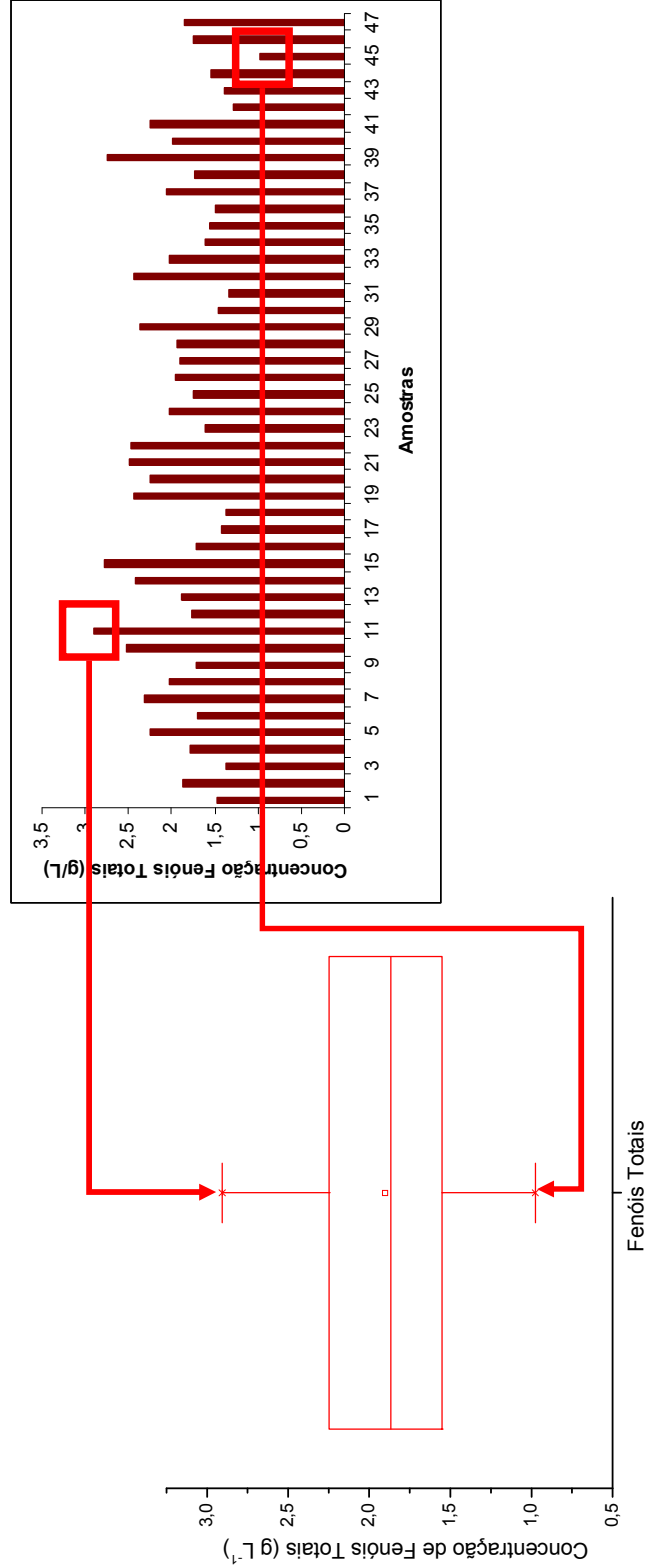
**TABELA 2.** RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE PRECISÃO (REPETIBILIDADE) DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS REALIZADA COM UMA AMOSTRA DE VINHO EM QUINTUPLICATA.

Replicata	Fenóis Totais (g L <sup>-1</sup> EAG)
1	1,97
2	1,86
3	1,90
4	1,93
5	2,04
Média	1,94
Desvio Padrão	0,07
Desvio Padrão Relativo (%)	3,5

Embora todos os valores se mostrem coerentes com os resultados apresentados por MAMEDE & PASTORE (2004), que demonstrou que os vinhos tintos de diversas nacionalidades possuem entre 1 e 4 g L<sup>-1</sup> de fenóis totais, ligeiras diferenças foram observadas entre vinhos tintos da America do Sul (média de 1,96 g L<sup>-1</sup>) e vinhos tintos brasileiros (média de 2,13 g L<sup>-1</sup>).

FREITAS (2006), em um estudo com vinhos tintos, verificou que a concentração de polifenóis totais variou de 0,49 a 1,72 g de EAG/L. Em todos os casos, nota-se que a concentração total de compostos fenólicos foi semelhante àquela encontrada para as amostras de vinho analisadas.

Como é conhecido, as quantidades de compostos fenólicos variam consideravelmente em tipos diferentes de vinhos, o que depende da variedade da uva, de fatores ambientais no vinhedo, das técnicas de processamento do vinho e do processo de produção e maturação (LI *et al.*, 2009a).



**FIGURA 16.** REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS (g L<sup>-1</sup>) NAS 47 AMOSTRAS DE VINHO TINTO.

Estudos realizados por LEITE (2009) demonstram que condições diversas no clima alteram drasticamente a concentração de fenóis totais em uvas. Nas condições padrão de temperatura e exposição à radiação testadas, o valor de fenóis totais foi igual a  $1,15 \text{ g L}^{-1}$ , um valor inferior a média ( $1,91 \text{ g L}^{-1}$ ) encontrada pela metodologia de referência para os vinhos tintos de diversas regiões do mundo. Quando a mesma amostra de uva foi submetida a condições adversas de frio e radiação UV, os valores foram alterados drasticamente. Em amostras expostas ao frio, a concentração alcançou valores de  $2,69 \text{ g L}^{-1}$ , as expostas à radiação alcançaram concentrações de  $6,63 \text{ g L}^{-1}$  e às expostas ao frio e à irradiação alcançaram concentrações de fenóis totais de  $9,72 \text{ g L}^{-1}$ , mostrando, novamente, que os fatores climáticos alteram significativamente os valores de fenóis em uvas.

As amostras 11 e 39 apresentam as maiores concentrações de fenóis totais (Figura 13A), ao mesmo tempo em que mostram elevada intensidade de absorção (Figura 8) e elevados valores de índice de cor (Figura 9). Por sua vez, as amostras 16, 17 e 18 apresentam as menores concentrações de fenóis totais, assim como baixos valores de absorção e intensidade de cor. Estas observações sugerem, pelo menos em primeira análise, que os dados espectrais podem fornecer informação relevante para a elaboração de modelos que objetivem a quantificação de formas fenólicas.

### 5.2.1. Modelagem Multivariada de Polifenóis Totais

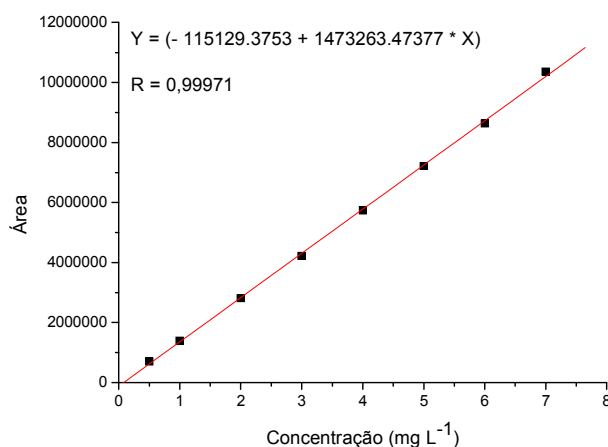
O método dos mínimos quadrados parciais (PLS), introduzido por WOLD (1966), é amplamente utilizado para desenvolvimento de modelos multivariados fundamentados e técnicas espectroscópicas. Neste trabalho, o PLS foi utilizado para desenvolver modelos de calibração para a determinação de fenóis totais, a partir de dados de espectroscopia eletrônica (400-800 nm). Os modelos foram desenvolvidos a partir de um conjunto de calibração composto por 41 amostras, sendo que as 5 amostras selecionadas para contemplar as mais diversas concentrações dentro do conjunto de amostras (A3, A16, A29, A37 e A44) foram reservadas para validação externa do modelo.

Objetivando melhorar a capacidade de previsão dos modelos multivariados, vários métodos de pré-processamento de sinais foram avaliados (dados centrados na média, alisados e derivados). Utilizando-se 4 variáveis latentes, escolhidas através do gráfico de RMSECV, que representam 44,21% da variância da matriz de concentração e 99,83% da variância da matriz de espectros, os modelos permitem a obtenção de erros de previsão (validação externa) da ordem de 15%, com pouca influência dos sistemas de pré-processamento utilizados (Tabela 3.)



### 5.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE t-RESVERATROL

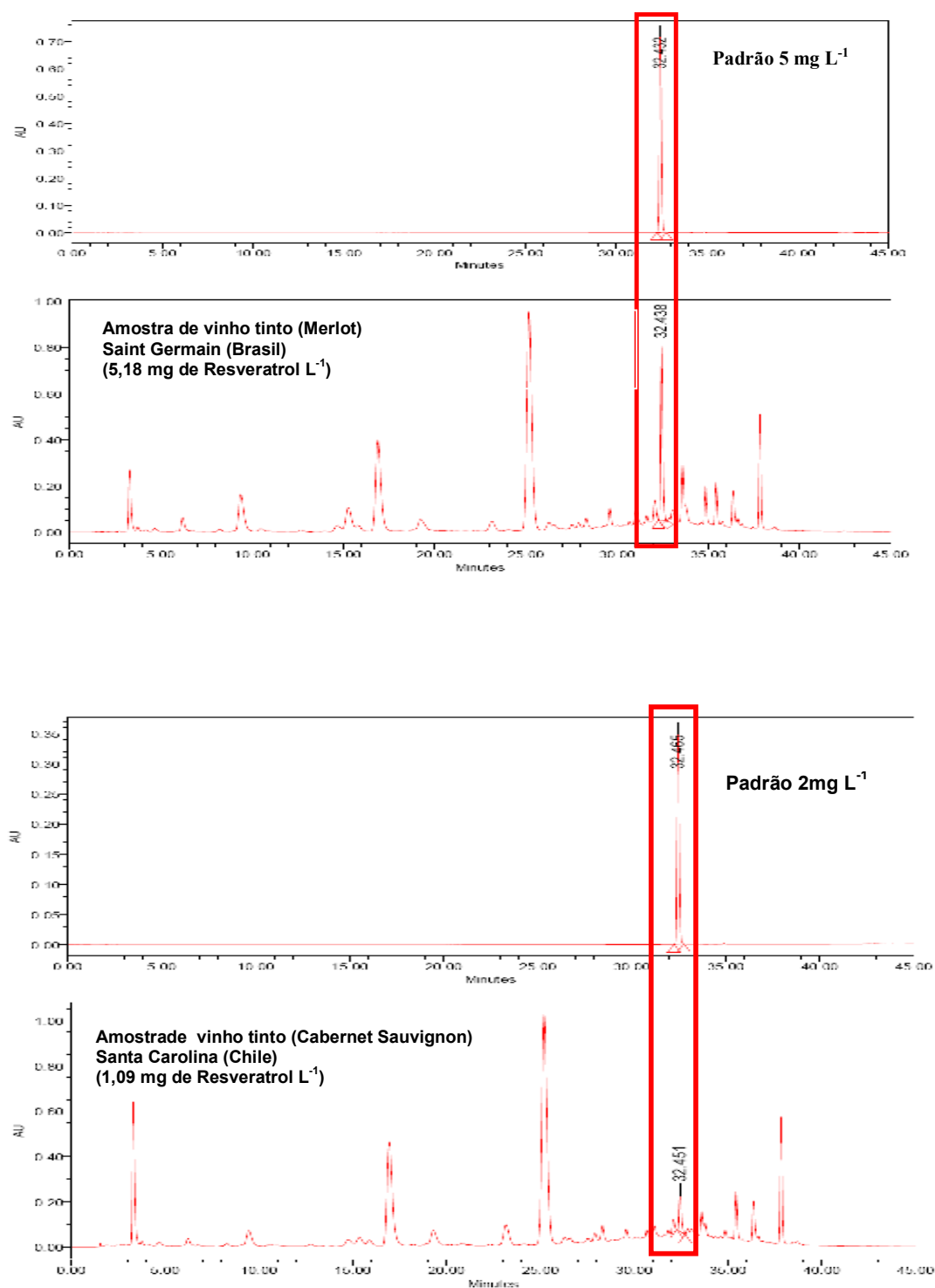
O t-resveratrol foi determinado por cromatografia em fase líquida de alta eficiência, após 4 extrações sucessivas em acetato de etila. A curva analítica foi elaborada entre 0,5 e 7,0 mg L<sup>-1</sup> de t-resveratrol (Figura 18), tomando como referência os resultados obtidos por SOUTO *et al.* (2001), que encontrou concentrações de t-resveratrol entre 0,82 e 5,75 mg L<sup>-1</sup> (com valor médio de 2,75 mg L<sup>-1</sup>) em amostras de vinhos tintos produzidos na região sul do Brasil.



**FIGURA 18.** CURVA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO TEOR DE t-RESVERATROL.

Na análise cromatográfica das 47 amostras de vinho, o teor de t-resveratrol foi calculado com base na área do pico de igual tempo de retenção (32,4 min) do pico apresentado pelos padrões de calibração (Figura 19). Em casos de sobreposição de picos, a identificação de t-resveratrol foi facilitada por adição de padrão.

Inicialmente, a precisão (repetibilidade) da metodologia foi avaliada por análise em triplicata de 3 amostras de vinho. Os valores médios encontrados nesta avaliação foram de 0,68 a 1,33 mg L<sup>-1</sup>, com desvios médios da ordem de 6% (Tabela 4). Desvios desta magnitude são superiores aos apresentados por metodologias cromatográficas fundamentadas em injeção direta das amostras (ZHOU *et al.*, 2004). Entretanto, mostram-se inferiores aos valores apresentados por metodologias precedidas por procedimentos de extração em fase sólida (RODRÍGUEZ-DELGADO *et al.*, 2002).



**FIGURA 19.** COMPARAÇÃO DE CROMATOGRAMAS DE AMOSTRAS DE VINHO TINTO COM PADRÕES DE t-RESVERATROL.



**TABELA 4.** RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE PRECISÃO (REPETIBILIDADE) DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE t-RESVERATROL REALIZADA COM TRÊS AMOSTRAS DE VINHO.

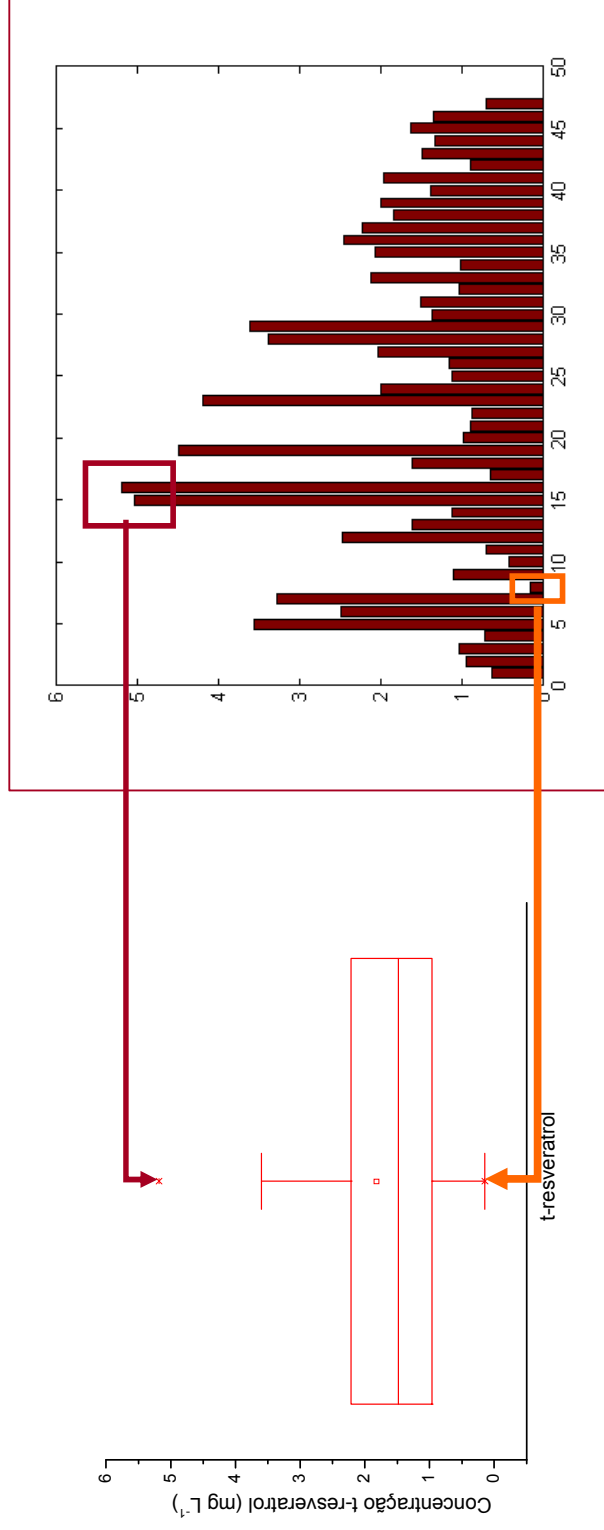
Amostra	Resultado (mg L <sup>-1</sup> )			Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo (%)
A3	1,02	1,18	1,10	1,10	0,08	7,27
A46	1,33	1,29	1,37	1,33	0,04	3,00
A47	0,62	0,73	0,64	0,68	0,05	8,83
				Média	0,05	6,36

Os resultados encontrados na análise das 47 amostras de trabalho são apresentados na Figura 20. Embora o intervalo de concentração encontrada esteja entre 0,14 e 5,75 mg L<sup>-1</sup>, grande parte das amostras apresentam concentração entre aproximadamente 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>, com valor médio da ordem de 1,8 mg L<sup>-1</sup> (ver Figura 20), que se mostra superior ao relatado para vinhos de diversas procedências (EUA: 1,30 mg L<sup>-1</sup>, Japão: 0,57 mg L<sup>-1</sup>, Canadá: 0,77 mg L<sup>-1</sup>, Grécia: 0,873 mg L<sup>-1</sup>, Portugal: 1 mg L<sup>-1</sup>, Chile/Argentina: 1,21 mg L<sup>-1</sup>, SOUTO *et al.*, 2001).

A faixa de concentração de t-resveratrol para vinhos brasileiros foi de 0,14 a 5,18 mg L<sup>-1</sup>, com valor médio de 2,19 mg L<sup>-1</sup>, valores estes muito próximos aos encontrados por SOUTO *et al.* (2001) em vinhos tintos da região sul do Brasil, em que a concentração de t-resveratrol foi de 0,82 a 5,75 mg L<sup>-1</sup>, com valor médio de 2,75 mg L<sup>-1</sup>.

A média (1,17 mg L<sup>-1</sup>) encontrada em vinhos Argentinos ficou abaixo da média encontrada na literatura, enquanto que a média (1,58 mg L<sup>-1</sup>) dos vinhos Chilenos ficou acima da média encontrada na literatura, que é de 1,21 mg L<sup>-1</sup>.

As diferenças observadas entre vinhos de diferentes procedências podem ser devidas a um conjunto de características conhecido como *terroir*, que reúne aspectos relacionados com o solo e o clima, dentre outras características locais.



**FIGURA 20.** REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CONCENTRAÇÃO DE t-RESVERATROL (mg L<sup>-1</sup>) NAS 47 AMOSTRAS DE VINHO TINTO E REPRESENTAÇÃO GRÁFICA NA FORMA DE “BOX-CHART”.

As amostras de vinho doadas pela vinícola Miolo, por exemplo, são oriundas de três regiões distintas do Estado do Rio Grande do Sul (Campanha Gaucha, Campos de Cima e Vale dos Vinhedos). Embora todas as amostras sejam da mesma varietal (Merlot), maiores quantidades de t-resveratrol foram observadas nas amostras procedentes do Vale dos Vinhedos. O mesmo foi observado em amostras advindas da vinícola Garibaldi, em que vinhos produzidos com uvas de origem de pequenos produtores do Vale dos Vinhedos apresentaram maior quantidade de t-resveratrol quando comparados a outros vinhos produzidos com uvas de outras regiões. Como a radiação solar é um dos principais fatores para estimular a produção de t-resveratrol, as variações nos resultados encontrados podem ser atribuídas a diferenças no clima. De acordo com mapas encontrados no site do governo do Estado do Rio Grande do Sul, a média da precipitação anual é semelhante nas 3 regiões, ficando entre 1700 a 1800 mm de chuva por ano, mas a temperatura média fica aproximadamente dois graus Celsius acima na região do Vale dos Vinhedos (ATLAS SÓCIOECONÔMICO RIO GRANDE DO SUL. Disponível em: <[http://www.scp.rs.gov.br/atlas/atlas.asp? menu=26](http://www.scp.rs.gov.br/atlas/atlas.asp?menu=26)> Acesso em: 20 set. 2009).

Nenhuma correlação evidente foi observada entre o teor de polifenóis totais (Figura 13) e o teor de t-resveratrol (Figura 16). Assim, a amostra 8, que apresenta a menor concentração de t-resveratrol, e a amostra 16, que apresenta o maior valor, apresentam valores intermediários de polifenóis totais.

Os cromatogramas apresentados na Figura 15 demonstram a presença de várias substâncias extraídas junto ao t-resveratrol, provavelmente de natureza polifenólica, devido à metodologia de extração. Em função desta hipótese, modelos multivariados foram desenvolvidos para a previsão do teor de polifenóis totais, a partir dos dados cromatográficos. Infelizmente, os erros de previsão foram da ordem de 30%, provavelmente em função da extração apenas parcial dos polifenóis da matriz de vinho.

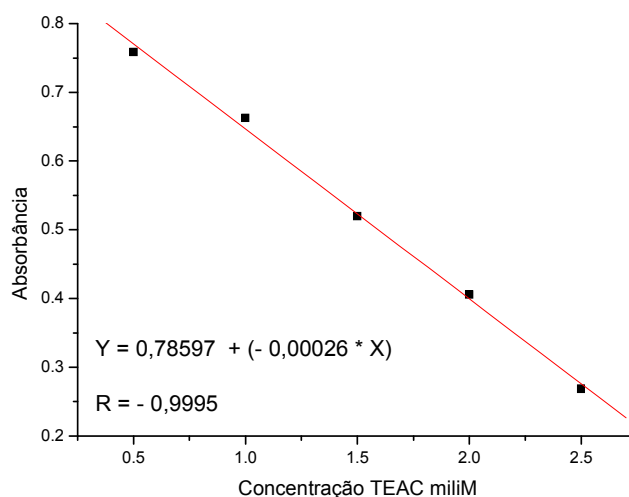
#### 5.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

RENAUD *et al.* (1998) relataram um grande interesse da população e da comunidade científica em relação aos antioxidantes naturais, principalmente em razão da sua importância farmacológica com relação ao controle de alguns tipos de doenças. Por sua vez, KUSKOSKI *et al.*, (2005), comparando diversas metodologias para avaliação da capacidade antioxidante de frutas e derivados, salientam as vantagens do método ABTS, principalmente as relacionadas com sua simplicidade e rapidez.

Para determinação da atividade antioxidante é utilizado o reagente Trolox, que é um antioxidante análogo à vitamina E. A longa cadeia linear saturada da vitamina E foi substituída por um hidrogênio, dando maior solubilidade para a molécula em água. A

TEAC reflete a capacidade do Trolox de inativar radicais livres com carga positiva, como o radical ABTS ( $\text{ABST}^{\cdot+}$ ), ao doar um hidrogênio.

A curva analítica foi elaborada entre 0,5 e 2,5 miliM de Trolox (Figura 21), em função dos valores médios observados em amostras de vinho durante a adaptação da metodologia figura (de 1,3 a 1,6 miliM de Trolox por mililitro de vinho). A Equação da curva analítica do Trolox com o radical ABTS foi:  $Y = 0,78597 - 0,00026 * X$ , onde Y é o valor da absorvância obtida em 730 nm para cada amostra e X a concentração referente ao potencial antioxidante da amostra relacionado ao Trolox (miliM). Boa linearidade foi observada nestas curvas de controle, com coeficientes de correlação (R) da ordem de 0,999.



**FIGURA 21.** CURVA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EQUIVALENTES EM TROLOX

Preliminarmente, a repetibilidade da metodologia foi avaliada por análise em duplicata de oito amostras de vinho tinto, encontrando-se os resultados apresentados na Tabela 5. Neste estudo foi observado um valor médio de 1,68 miliM, com um desvio padrão relativo médio de 3,65 %.

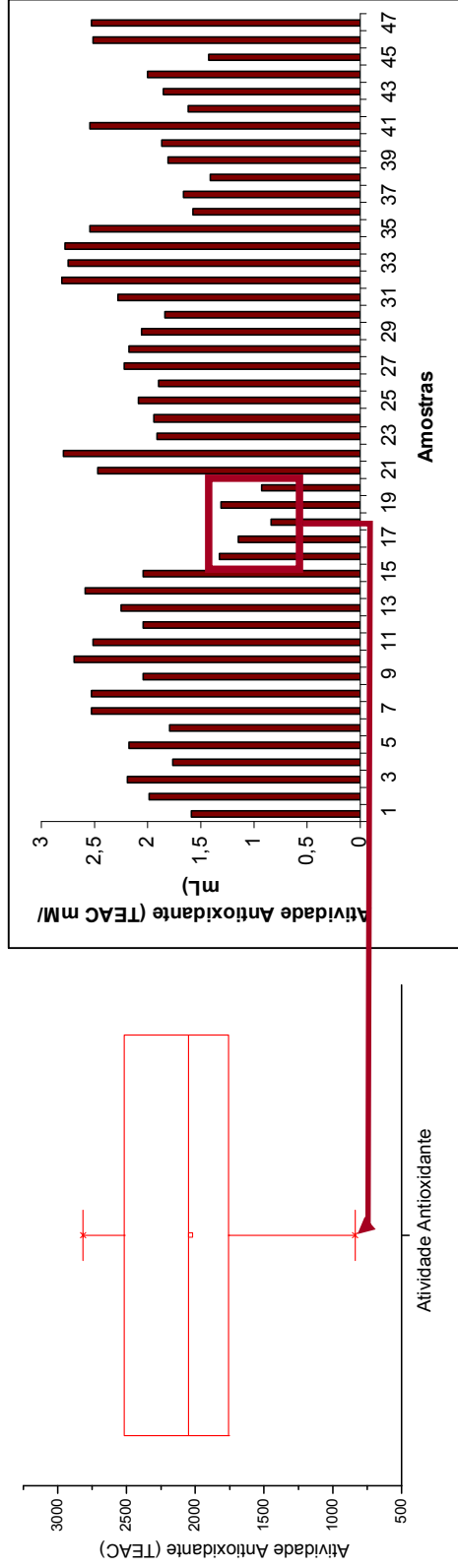
**TABELA 5.** RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE PRECISÃO (REPETIBILIDADE) DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS REALIZADA COM OITO AMOSTRAS DE VINHO EM DUPLICATA.

Amostra	Resultados (miliM TEAC)		Média	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo (%)
A3	2,38	2,33	2,35	0,04	1,77
A4	2,88	3,06	2,97	0,13	4,26
A32	0,55	0,47	0,51	0,06	11,63
A33	0,60	0,61	0,61	0,005	0,93
A34	0,61	0,62	0,61	0,002	0,34
A35	1,24	1,17	1,21	0,05	4,21
A36	4,07	3,90	3,98	0,12	3,04
A46	1,27	1,22	1,24	0,04	3,01
		<b>Média</b>	<b>1,69</b>	<b>0,055</b>	<b>3,65</b>

Os resultados da avaliação de atividade antioxidante, expressa em miliM de Trolox por mL de vinho, são apresentados na Figura 22. Os valores mínimo e máximo desse parâmetro corresponderam a 0,83 e 2,79, enquanto que o valor médio foi de 2,03 miliM de Trolox (TEAC). Estes resultados são compatíveis com os resultados publicados na literatura, os quais indicam um intervalo entre 0,91 e 3,05 (LI *et.al.*, 2009).

A menor atividade antioxidante (AAT) foi observada nas amostras A16, A17, A18, A19 e A20. Entretanto, esta característica não se correlaciona com o teor de fenóis totais ou de t-resveratrol. Isto é, amostras que possuem baixa atividade antioxidante não apresentaram, necessariamente, baixos teores de t-resveratrol e ou de fenóis totais.

O radical ABTS<sup>•+</sup> tem sido extensivamente usado para avaliar a capacidade antioxidante de vinhos (STASKO *et al.*, 2008), ao mesmo tempo em que vários estudos têm sido realizados para verificar a relação existente entre atividade antioxidante e concentração de polifenóis. VILLANO *et al.* (2004), por exemplo, verificaram uma boa correlação entre o conteúdo de fenol total e o potencial oxidante medido pelo método ABTS, com valores de coeficiente de correlação (R) variando entre 0,9896 e 0,9939 para as variedades de uva Couderc e Pinot Gris.

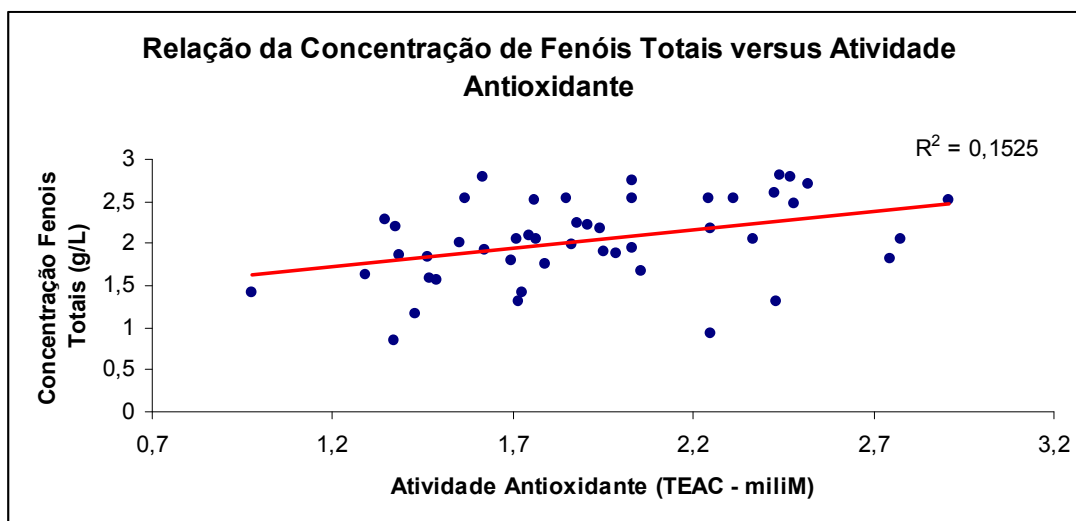


**FIGURA 22.** REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (EQUIVALENTES DE TROLOX, MÉTODO ABTS) DAS 47 AMOSTRAS DE VINHO TINTO E REPRESENTAÇÃO GRÁFICA NA FORMA DE “BOX-CHART”.

Fazendo-se a correlação com os dados obtidos neste trabalho (Figura 23), observa-se uma tendência geral que confirma a conexão entre estes parâmetros. Entretanto, existem vários casos em que a correlação é baixa, o que faz com que os coeficientes de correlação sejam muito inferiores aos relatados na literatura. Relacionando-se todas as amostras (diversas nacionalidades e espécies de uva) obtém-se um coeficiente de correlação (R) de 0,15, enquanto que comparando-se apenas uma espécie de uva, mas com diferentes safras e nacionalidades, consegue-se um valor de R de 0,38. No melhor dos casos, envolvendo amostras produzidas na mesma safra e com o mesmo tipo de uva, observam-se valores de R de 0,63, ainda bastante baixos em relação aos antecedentes da literatura.

Para ilustrar esta falta de correlação podem-se salientar os resultados apresentados pela amostra 19, que apresenta uma das mais baixas capacidades antioxidante e concentração de fenóis totais acima da média. Por sua vez, a amostra 34 apresenta um dos mais elevados valores de atividade antioxidante, ao mesmo tempo em que mostra um teor de espécies fenólicas bem abaixo da média.

Observações similares podem ser realizadas em relação à correlação existente entre a capacidade antioxidante e o teor de t-resveratrol. Neste caso, a baixa concentração relativa de t-resveratrol justifica a sua pouca influência na capacidade antioxidante das amostras de vinho.



**FIGURA 23.** CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS ( $\text{g L}^{-1}$ ) E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (TEAC,  $\text{milim mL}^{-1}$ ) NAS AMOSTRAS ANALISADAS.

De maneira geral, admite-se que grande parte da atividade antioxidante das amostras de vinho seja uma função das espécies polifenólicas características. Desta forma, a falta de correlação entre estes parâmetros pode ser uma função da falta de seletividade da técnica utilizada para a determinação de polifenóis totais (método de Folin-Ciocalteu).

#### 5.4.1. Modelagem Multivariada da Atividade Antioxidante

Em função da correlação existente entre a capacidade antioxidante do vinho, o teor de espécies polifenólicas e o sinal espectral registrado entre 400 e 800 nm, modelos multivariados foram desenvolvidos por regressão por mínimos quadrados parciais.

Referidos modelos foram desenvolvidos a partir da informação espectral de 41 amostras de vinho, enquanto que outras 5 foram reservadas para validação externa. Diversos sistemas de pré-processamento de sinais foram avaliados, destacando dados centrados na média, alisados e derivados.

O modelo de melhor desempenho foi elaborado com dados espectrais centrados na média e 5 variáveis latentes, as quais permitiram representar aproximadamente 50% da variância dos dados de atividade antioxidante, a partir de 80% da variância dos dados espectrais. Nestas condições, erros médios de previsão da ordem de 4% foram observados na fase de validação externa (Tabela 6).

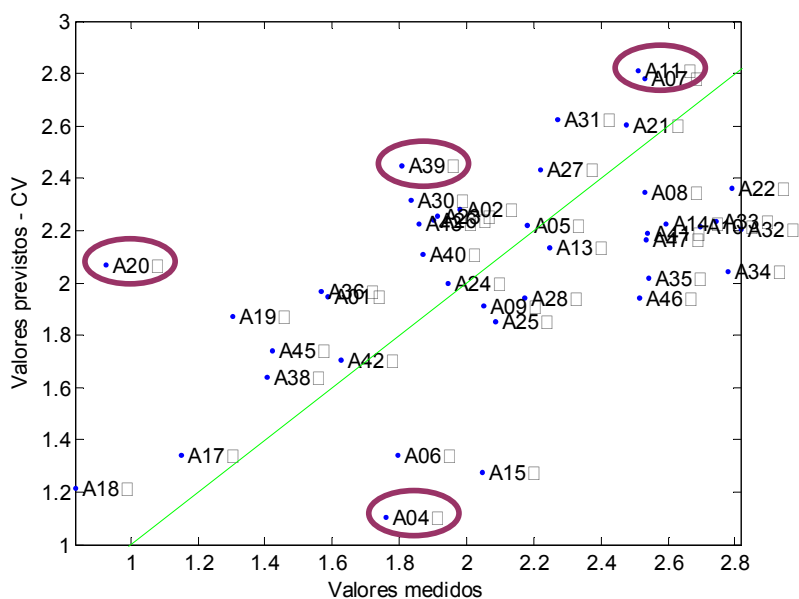
**TABELA 6.** PREVISÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA UTILIZANDO MODELOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE 5 VARIÁVEIS LATENTES E ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA (CM), EM PRIMEIRA DERIVADA (1ª DERIV.) E EM SEGUNDA DERIVADA (2ª DERIV.).

Amostra	AAT Experimental (miliM TEAC)	AAT Prevista (miliM TEAC)					
		CM	Erro (%)	1ª deriv.	Erro (%)	2ª deriv.	Erro (%)
A3	2,18	2,56	17,43	2,17	-0,46	2,08	-4,58
A16	1,32	1,30	- 1,52	1,21	-8,33	1,10	-16,66
A29	2,26	2,26	0,0	2,23	-1,32	2,02	-10,62
A37	1,61	1,61	0,0	1,36	-15,52	1,35	-16,14
A44	1,70	1,70	0,0	1,69	-0,59	1,41	-17,06
<b>Média</b>			<b>3,79</b>		5,25		13,01

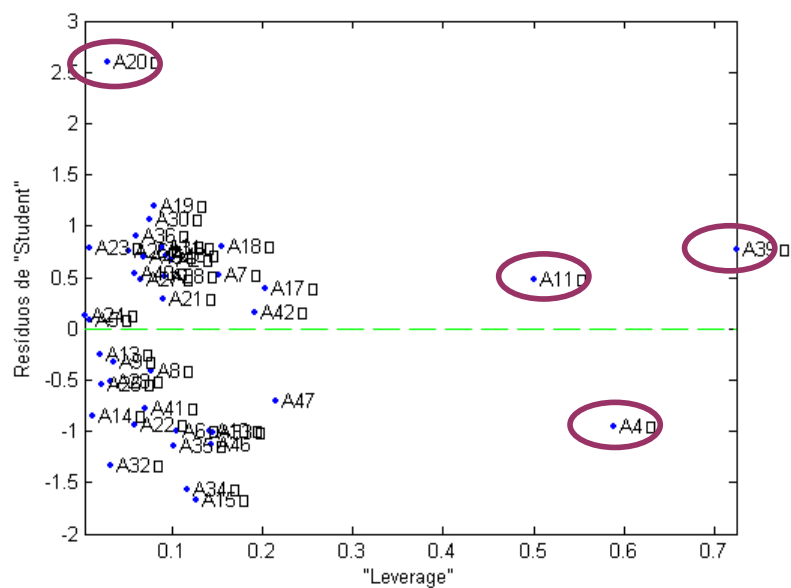


Embora a capacidade de previsão do modelo se mostre adequada, em relação ao conjunto de validação externa, foi observada uma baixa correlação entre valores medidos pelo método de referência e valores previstos pelo modelo, para o conjunto de calibração ( $R = 0,57$ , Figura 24). Adicionalmente, o gráfico de resíduos de Student *versus* Leverage (Figura 25) permitiu identificar várias amostras anômalas (amostra 20 com resíduo  $> 2,5$  e amostras 4, 11 e 39 com  $\text{leverage} > 0,36$ ), as quais, justamente, apresentam os maiores desvios no gráfico de valores reais por previstos (Figura 24).

Em função desta constatação, as amostras anômalas foram retiradas do conjunto de calibração, desenvolvendo-se novos modelos multivariados ( $n=37$ ). Novamente, modelos foram elaborados com diversos números de variáveis latentes e sistemas de pré-processamento de sinais. Os modelos de melhor desempenho foram elaborados com 4 variáveis latentes, apresentando excelente capacidade de previsão na fase de validação externa (Tabela 7). A utilização de 4 VLs permitiu representar aproximadamente 60% da variância dos dados de atividade antioxidante, a partir de aproximadamente 97% da variância dos dados espectrais.



**FIGURA 24.** RELAÇÃO ENTRE VALORES OBTIDOS PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA E VALORES PREVISTOS PELO MODELO COM DADOS CENTRADOS NA MÉDIA E USANDO 5 VARIÁVEIS LATENTES.

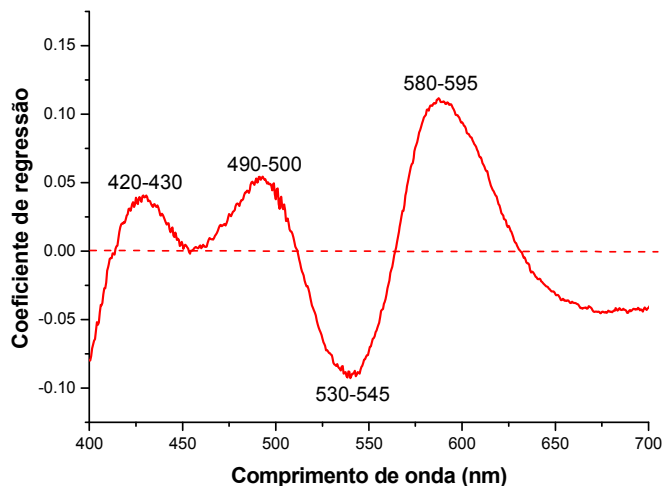


**FIGURA 25.** GRÁFICO DE RESÍDUOS DE "STUDENT" *versus* "LEVERAGE" OBTIDO PELO MODELO PLS COM 5 VARIÁVEIS LATENTES E OS DADOS CENTRADOS NA MÉDIA.

**TABELA 7.** PREVISÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA UTILIZANDO MODELOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE 4 VARIÁVEIS LATENTES E ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA (CM) E EM PRIMEIRA DERIVADA (1ª DERIV.).

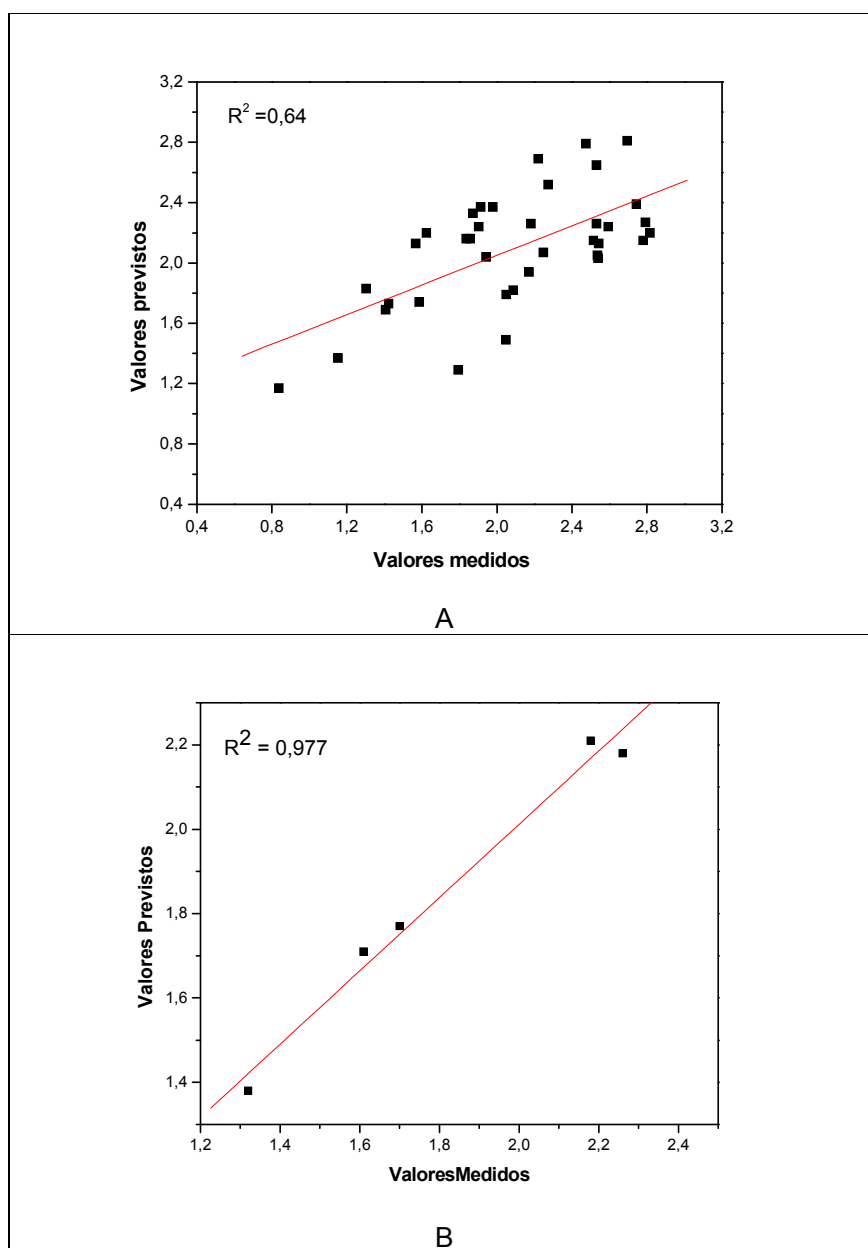
AMOSTRA	AAT Experimental (miliM TEAC)	AAT Prevista (miliM TEAC)			
		CM	Erro (%)	1ª deriv.	Erro (%)
A3	2,18	2,14	-1,83	2,18	0
A16	1,32	1,31	- 0,75	1,25	-5,30
A29	2,26	2,11	-6,63	2,11	-6,63
A37	1,61	1,63	1,24	1,61	0
A44	1,70	1,67	-1,76	1,63	-4,11
<b>Média</b>			<b>2,44</b>		<b>3,21</b>

Na Figura 26 se apresenta o vetor de regressão obtido na modelagem de dados centrados na média com 4 variáveis latentes. Nesta Figura, que representa as regiões espectrais de relevância para estabelecimento da modelagem, é possível observar regiões de regressão positiva (centradas em aproximadamente 420, 490 e 580 nm) e negativa (540 nm), cada uma das quais pode ser correlacionada com espécies polifenólicas de relevância, conforme discutido no item 5.1.



**FIGURA 26.** VETOR DE REGRESSÃO OBTIDO NA MODELAGEM DE DADOS CENTRADOS NA MÉDIA COM 4 VARIÁVEIS LATENTES.

Na Figura 27 são apresentados os gráficos que relacionam os valores esperados da atividade antioxidante com os estimados pelo modelo para o conjunto de validação cruzada (A, 37 amostras) e para o conjunto de validação externa (B: 5 amostras), utilizando-se o modelo elaborado com dados centrados na média e 5 variáveis latentes. Enquanto a capacidade de previsão em relação ao conjunto de validação externa se apresenta excelente ( $R^2 = 0,977$ ), a previsão do conjunto de amostras na etapa de validação cruzada apresenta algumas inconsistências ( $R^2 = 0,64$ ). A referida inconsistência implica que, para algumas amostras de vinho, as regiões espectrais processadas sofrem influência de espécies químicas que não contribuem com a capacidade antioxidante avaliada (interferência) ou espécies que efetivamente contribuem com a expressão de atividade antioxidante não possuem sinal espectral na região processada.

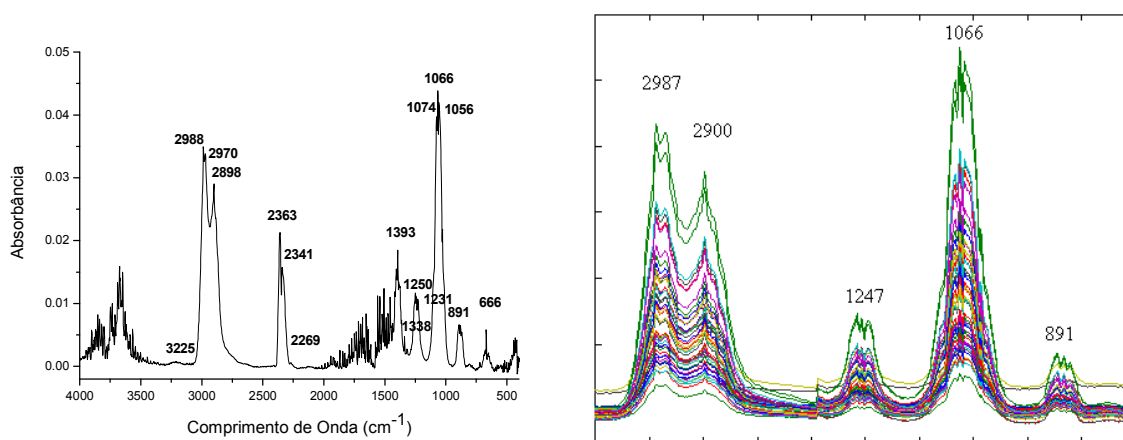


**FIGURA 27.** GRÁFICO DOS VALORES PREVISTOS *versus* VALORES MEDIDOS PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA PARA O CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO NA ETAPA DE VALIDAÇÃO CRUZADA (A) E PARA O CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA (B).

### 5.5. CARACTERIZAÇÃO DE VINHOS POR ESPECTROMETRIA FTIR-ATR

Amostras de vinho apresentam um espectro na região do infravermelho relativamente simples com bandas bem caracterizadas, principalmente na região compreendida entre 900 e 2000  $\text{cm}^{-1}$  (TARANTILIS *et al.*, 2008). Infelizmente, os espectros adquiridos no modo de refletância total atenuada (Figura 28) apresentaram baixa intensidade, em função de problemas no ajuste do equipamento.

De qualquer forma, modelos multivariados foram elaborados para previsão do teor de fenóis totais, t-resveratrol e da atividade antioxidante, utilizando-se toda a informação espectral registrada entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , com exceção das regiões atribuídas a  $\text{CO}_2$  e água. Como de costume, inúmeros modelos foram desenvolvidos, utilizando-se vários números de variáveis latentes e diversos sistemas de pré-processamento de sinais.



**FIGURA 28.** ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS DE VINHO DE 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ .

Para previsão do teor de fenóis totais os melhores modelos foram desenvolvidos com 5 variáveis latentes, utilizando-se dados centrados na média e derivados. De maneira geral, a capacidade de previsão dos modelos não foi adequada (erro relativo médio da ordem de 15%), tal como pode ser observado nos resultados da fase de validação externa apresentados na Tabela 8. Em função da região espectral processada conter sinais característicos da fração fenólica, estima-se que a baixa capacidade de previsão seja devida à baixa reprodutibilidade na aquisição dos espectros.

**TABELA 8.** PREVISÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS NO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA UTILIZANDO MODELOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE 5 VARIÁVEIS LATENTES E ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA (CM) UTILIZANDO ALISAMENTO E PRIMEIRA DERIVADA (1ª DERIV.).

AMOSTRA	Fenóis Totais Experimental (g L <sup>-1</sup> EAG)	Fenóis Totais Previsto (g L <sup>-1</sup> EAG)			
		CM	Erro (%)	1ª deriv.	Erro (%)
A3	1,37	1,90	38,68	1,44	5,11
A16	1,72	1,45	-15,69	1,42	-17,44
A29	2,24	1,58	-29,46	1,59	-29,01
A37	2,06	1,72	-16,50	1,65	-19,90
A44	1,55	1,62	4,52	1,60	3,23
Média			<b>20,95</b>		<b>14,94</b>

O desenvolvimento de modelos para a previsão do teor de t-resveratrol foi realizado de maneira similar, encontrando-se os resultados apresentados na Tabela 9. O modelo com menores erros de previsão para o conjunto de validação externa foi desenvolvido com 5 variáveis latentes e dados espectrais derivados, condição que permitiu erros médios da ordem de 20%. Neste caso, a baixa capacidade de previsão, além de ser explicada pela baixa intensidade dos espectros, pode ser uma função da baixa concentração relativa de t-resveratrol nas matrizes em análise.

**TABELA 9.** PREVISÃO DO TEOR DE t-RESVERATROL NO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA UTILIZANDO MODELOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE 5 VARIÁVEIS LATENTES E ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA (CM) E EM PRIMEIRA DERIVADA (1ª DERIV.).

AMOSTRA	t-Resveratrol Experimental (mg L <sup>-1</sup> )	t-Resveratrol Previsto (mg L <sup>-1</sup> )			
		CM	Erro (%)	1ª deriv.	Erro (%)
A3	1,02	2,05	100,9	1,31	28,43
A16	5,18	2,10	-59,46	3,88	-25,09
A29	3,60	1,48	-58,89	2,03	-43,61
A37	2,21	2,44	10,40	2,24	1,36
A44	1,32	0,60	-54,54	1,35	2,27
Média			<b>56,84</b>		<b>20,15</b>

Finalmente, modelos multivariados foram elaborados para a previsão de atividade antioxidante, encontrando-se os resultados apresentados na Tabela 10. Utilizando-se 5 variáveis latentes e dados espectrais centrados na média (ou derivados), erros médios de previsão da ordem de 15 a 20% foram observados, mesmo eliminando-se amostras que apresentaram algum tipo de anomalia. Novamente, a baixa capacidade de previsão pode ser explicada pela baixa qualidade dos dados espectrais processados.

**TABELA 10.** PREVISÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA UTILIZANDO MODELOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE 5 VARIÁVEIS LATENTES E ESPECTROS CENTRADOS NA MÉDIA (CM) E EM PRIMEIRA DERIVADA (1ª DERIV.).

AMOSTRA	Atividade Antioxidante (miliM TEAC)	Atividade Antioxidante Prevista (miliM TEAC)			
		CM	Erro (%)	1ª deriv.	Erro (%)
A3	2,19	1,67	-23,74	1,75	-20,09
A16	1,31	1,20	- 8,39	1,21	-7,63
A29	2,06	1,73	-16,02	1,81	-12,13
A37	1,67	1,91	14,37	1,97	17,96
A44	2,00	1,30	-35,00	1,63	-18,50
<b>Média</b>			<b>19,50</b>		<b>15.26</b>

## 6. CONCLUSÕES

---

As amostras de vinhos analisadas pelo método Folin-Ciocalteu apresentaram teores de compostos fenólicos muito próximos aos encontrados na literatura, variando entre 0,97 e 2,91 g L<sup>-1</sup>, com média de 1,91g L<sup>-1</sup>. Esta variabilidade confirma a dependência existente entre o teor de compostos fenólicos totais e os tipos de vinhos, particularmente em relação a características como variedade da uva, fatores ambientais no vinhedo e técnicas de processamento e maturação.

Os valores médios de t-resveratrol foram coerentes com os relatados na literatura para vinhos similares de diversas regiões. Em média, os vinhos argentinos apresentaram baixos teores de t-resveratrol (1,17 mg L<sup>-1</sup>), ao mesmo tempo em que os vinhos chilenos apresentaram valores mais elevados (1,58 mg L<sup>-1</sup>). As amostras de vinho Merlot produzidas no Vale dos Vinhedos (RS) possuem uma maior quantidade de t-resveratrol do que análogos produzidos nas regiões da Campanha Gaucha e Campos de Cima, provavelmente em razão de diferenças climáticas.

A atividade antioxidante, determinada pelo método ABTS, variou entre 0,927 e 2,792 miliM de Trolox, valores que são compatíveis com os valores descritos na literatura. A correlação observada entre o potencial antioxidante e a concentração de fenóis totais é bastante inferior à relatada na literatura, provavelmente em função da baixa seletividade do método de Folin-Ciocalteu.

A Análise de Componentes Principais aplicada aos dados espectrais permitiu verificar certa distinção entre vinhos maduros (safra de 2000, 2004, 2005 e 2006) e jovens (safra de 2007 e 2008), provavelmente em razão da diferenciação espectral causada por reações que acontecem durante a maturação do vinho (ex. oxidação dos compostos fenólicos, polimerização das antocianinas, etc.)

Modelos de calibração multivariada desenvolvidos para correlacionar espectros eletrônicos com o teor de fenóis totais não apresentaram boa capacidade preditiva, permitindo a obtenção de erros relativos médios da ordem de 10% para o conjunto de validação.

A combinação das medidas espectroscópicas no visível com calibração multivariada permitiu a análise quantitativa da atividade antioxidante. Os resultados estimados foram consistentes, com boa concordância entre os valores previstos pelo modelo e valores do método de referência. Observou-se que o menor erro de previsão foi obtido excluindo-se as amostras anômalas, com os dados centrados na média e utilizando-se 5 variáveis latentes. Nestas condições, foram observados erros relativos médios da ordem de 2% para o conjunto de validação.



## 7. REFERÊNCIAS

---

- ABE, L. T.; MOTA, R. V. da ; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. da região de Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- AMARAL, F. M.; CARO, M. S. B. Investigation of different pre-concentration methods for NMR analyses of Brazilian white wine. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 507-510, 2005.
- AMERINE, A.; JOSLYN, M. A. **Composition of grapes and distribution of phenolics from table wines, the technology of their production**. Berkeley: University of California Press, 1987. p. 234-238.
- AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. **Wine and must analysis**. New York: John Willey; Sons, p.377, 1988.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.
- ANTUNES, A. J.; CANHOS, V. P. **Aditivos Em Alimentos**. 1. ed. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1983. 178 p.
- ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, p. 199-212, 1998.
- ASEN, S.; STEWART, R. N.; NORRIS, K. H. Copigmentation of anthocyanins in plant tissue and its effect on color. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1139-1143, 1972.
- ATHANASAS, K.; MAGIATIS, P.; FOKIALAKIS, N.; SKALTSOUNIS, A.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D. Hyperjovinols A and B: Two new phloroglucinol derivatives from *Hypericum jovis* with antioxidant activity in cell cultures. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 6, p. 973-977, 2004.
- ATLAS SÓCIOECONÔMICO RIO GRANDE DO SUL. Disponível em: <<http://www.scp.rs.gov.br/atlas/atlas.asp?menu=26>> Acesso em: 20 set. 2009.
- BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; LORENTE, J.; ORTUÑO, A.; DEL RIO, J. A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 457-462, 2000.

- BILICI, M.; EFE, H.; KOROGU, M. A.; UYDU, H. A.; BEKAROGLU, M.; DEGER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, v. 64, n. 1, p. 43-51, 2001.
- BIRCH, A. E.; FENNER, G. P.; WATKINS, R.; BOYD, L. C. Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4502-4507, 2001.
- BISHAYEE, A.; DHIR, N. Resveratrol-mediated chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis: Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, p. 131-144, 2009.
- BLANCO, V. Z.; AUW, J. M.; SIMS, C. A.; O'KEEFE, S. F. Effect of processing on phenolics of wines. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 434, p. 327-340, 1998.
- BORDONE, L.; MOTTA, M. C.; PICARD, F.; ROBINSON, A.; JHALA, U. S.; APFELD, J.; McDONAGH, T.; LEMIEUX, M.; MCBURNEY, M.; SZILVASI, A.; EASLON, E. J.; LIN, S. J.; GUARENTE, L. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. **PLoS Biology**, v. 4, n. 2, p. 210-220, 2006.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- BRAVO, M. N.; SILVA, S.; COELHO, A. V.; VILAS BOAS, L.; BRONZE, M. R. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 84-92, 2006.
- BRENNAN, O. V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4841-4844, 2001.
- BRIVIBA, K.; PAN, L.; RECHKEMMER, G. Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 2814-2818, 2002.
- BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 1-39.
- BUDINI, R.; TONELLI, D.; GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the Prussian blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 1236-1238, 1980.

- BURNS, J.; GARDNER, P. T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G. G.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 12, p. 5797-5808, 2001.
- CADET, J.; DELATOUR, T.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; POUGET, J. P.; RAVANAT, J. L.; SAUVAIGO, S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. **Mutation Research**, v. 424, n. 1-2, p. 9-21, 1999.
- CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, p. 2157-2184, 2004.
- CARLAN, C. U. Vinho, 7 mil anos de idade. **Revista História Viva**, São Paulo, n. 17, p. 6-15, 2008.
- CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; LORENTE, J.; ALCARAZ, M.; REDONDO, A.; ORTUÑO, A.; DEL RIO, J. A. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced *in vivo* by x-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): Comparative study versus other phenolic and organic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1738-1745, 2000.
- CAVINATO, A. G.; MAYES, D. M.; GE, Z. H.; CALLIS, J. B. Noninvasive method for monitoring ethanol in fermentation processes using fiber-optic near infrared spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 1977-1982, 1990.
- CERUTTI, P. A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, v. 344, n. 8926, p. 862-863, 1994.
- CORDONNIER, R. A bioquímica do vinho. **Scientific American Brasil**, v. 1, p. 22-35, 2007.
- COSTA, C. T.; HORTON, D.; MARGOLIS, S. A. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1-2, p. 403-410, 2000.
- COZZOLINO, D.; SMYTH, H. E.; GISHEN, M. Feasibility study on the use of visible and near-infrared spectroscopy together with chemometrics to discriminate between commercial white wines of different varietal origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 26, p. 7703-7708, 2003.

- DANZ, E. D. B.; SKRAMSTED, J.; HENRY, N.; BENNETT, J. A.; KELLER, R. S. Resveratrol prevents doxorubicin cardiotoxicity through mitochondrial stabilization and the Sirt1 pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 12, p. 1589-1597, 2009.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- DELLA-MORTE, D.; DAVE, K. R.; DeFAZIO, R. A.; BAO, Y. C.; RAVAL, A. P.; PEREZ-PINZON, M. A. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a Sirtuin 1–Uncoupling Protein 2 pathway. **Neuroscience**, v. 159, p. 993-1002, 2009.
- DENG, C. X. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 147-152, 2009.
- DENICOLA, A.; FREEMAN, B. A.; TRUJILLO, M.; RADI, R. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 333, n. 1, p. 49-58, 1996.
- DESMARCHELIER, C.; REPETTO, M.; COUSSIO, J.; LLESUY, S.; CICCIA, G. Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in Southwest Amazonia (Bolivia and Peru). **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, p. 288-296, 1997.
- DONOVAN, J. L.; BELL, J. R.; KASIM-KARAKAS, S.; GERMAN, J. B.; WALZEM, R. L.; HANSEN, R. J.; WATERHOUSE, A. L. Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1662- 1668, 1999.
- EISERICH, J. P.; CROSS, C. E.; JONES, A. D.; HALLIWELL, B.; VAN DER VLIET, A. Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 32, p. 19199-19208, 1996.
- EL-SHERBINY, D. A.; KHALIFA, A. E.; ATTIA, A. S.; ELDENSHARY, E. E. S. *Hypericum perforatum* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 76, p. 525-533, 2003.

- FEILLET-COUDRAY, C.; SUTRA, T.; FOURET, G.; RAMOS, J.; WRUTNIAK-CABELLO, C.; CABELLO, G.; CRISTOL, J. P.; COUDRAY, C. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 624-632, 2009.
- FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993.
- FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENI, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 1035-1040, 1999.
- FRANKEL, E. N.; KANNER, J.; GERMAN, J. B.; PARKS, E.; KINSELLA, J. E. Inhibition of human low density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **Lancet**, v. 341, p. 454-457, 1993.
- FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; TEISSEDRE, P. L. Principal phenolic phytochemical in selected California Wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 890-894, 1995.
- FREITAS, D. M. **Evolução dos parâmetros cromáticos e compostos fenólicos na conservação de vinhos tintos**. Santa Maria, 2000. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria.
- FREITAS, D. M. **Variação dos compostos fenólicos e de cor dos vinhos de uvas (*Vitis vinifera*) tintas em diferentes ambientes**. Santa Maria, 2006. 42 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria.
- GALLIGNANI, M.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Derivative Fourier transform infrared spectrometric determination of ethanol in alcoholic beverages. **Analytica Chimica Acta**, v. 287, p. 275-283, 1994.
- GAMIOTEA-TURRO, D.; CUESTA-RUBIO, O.; PRIETO-GONZÁLEZ, S.; DE SIMONE, F.; PASSI, S.; RASTRELLI, L. Antioxidative constituents from the leaves of *Hypericum styphelioides*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 869-871, 2004.
- GARCÍA-FALCÓN, M. S.; PÉREZ-LAMELA, C.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; SIMAL-GÁNDARA, J. Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. **Food Chemistry**, v. 105, n. 1, p. 248-259, 2007.

- GLORIES, Y. La couleur des vins rouges. 2e. Partie: mesure, origine et interpretation. **Connaissance de la Vigne et du Vin**, v. 18, p. 253-271, 1984.
- GOLDBERG, D. M.; YAN, J.; NG, E.; DIAMANDIS, E. P.; KARUMANCHIRI, A.; SOLEAS, G.; WATERHOUSE, A. L. A global survey of *trans*-resveratrol concentration in commercial wine: preliminary survey of its concentration in commercial wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 46, n. 2, p. 159-165, 1995.
- GOUVEIA-MATOS, J. A. M. *Pasteur*: ciência para ajudar a vida. **Química Nova na Escola**, n. 6, p. 20-22, 1997.
- HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: Encyclopedia of Life Sciences. **Nature Publishing Group**, p. 1-7, 2001.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Research**, v. 25, n. 1, p. 57-74, 1996.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 1609-1623, 1992.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- HAMID, A. A.; SHAH, Z. M.; MUSE, R.; MOHAMED, S. Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. **Food Chemistry**, v. 77, n. 4, p. 465-469, 2002.
- HASLAM, E. In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2577, 1980.
- HEIER, A.; BLAAS, W.; DROß, A.; WITTKOWSKI, R. Anthocyanin analysis by HPLC/ESI-MS. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, n. 1, p. 78-86, 2002.
- HEILMANN, J.; WINKELMANN, K.; STICHER, O. Studies on the antioxidative activity of phloroglucinol derivatives isolated from *Hypericum* species. **Planta Medica**, v. 69, p. 202-206, 2003.
- HERRERA, J.; GUESALAGA, A.; AGOSIN, E. Shortwave-near infrared spectroscopy for nondestructive determination of maturity of wine grapes. **Measurement Science and Technology**, v. 14, p. 689-697, 2003.
- HUNT, E. J.; LESTER, C. E.; LESTER, E. A.; TACKETT, R. L. Effect of St. John's wort on free radical production. **Life Sciences**, v. 69, p. 181-190, 2001.

- HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hidroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2489-2491, 1987.
- IBERN-GÓMEZ, M.; ANDRÉS-LACUEVA, C.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; WATERHOUSE, A. L. Rapid HPLC analysis of phenolic compounds in red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 53, n. 3, p.218-221, 2002.
- IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1811-1815, 2003.
- JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. (Eds.) **Natural Food Colorants**. 2. ed. Londres: Chapman & Hall, 1996. p. 245-309.
- JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G. O.; SLOWING, K. V.; THOMAS, C. F.; EECHER, C. W. W.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; DOUGLAS-KINHORN, A.; METHA, R. G.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 257, p. 218-220, 1997.
- JEANDET, P.; BESSIS, R.; GAUTHERON, B. The production of resveratrol (3, 5, 4')-trihydroxystilbene by grape berries in different development stages. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 42, p. 41-46, 1991.
- JEANDET, P.; BREUIL, A. C.; ADRIAN, M.; WESTON, L. A.; DEBORD, S.; MEUNIER, P.; MAUME, G.; BESSIS, R. HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 24, p. 5172-5177, 1997.
- JHUMKA, Z.; PERVAIZ, S.; CLÉMENT, M. V. Resveratrol regulates the expression of NHE-1 by repressing its promoter activity: Critical involvement of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and caspases 3 and 6 in the absence of cell death. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 945-956, 2009.
- KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA A. I.; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4076-4082, 2001.
- KANG, O. H.; JANG, H. J.; CHAE, H. S.; OH, Y. C.; CHOI, J. G.; LEE, Y. S.; KIM, J. H.; KIM, Y. C.; SOHN, D. H.; PARK, H.; KWON, D. Y. Anti-inflammatory mechanisms of resveratrol in activated HMC-1 cells: pivotal roles of NF- $\kappa$ B and MAPK. **Pharmacological Research**, v. 59, n. 5, p. 330-337, 2009.

- KEEVIL, S.; ADAMS, G.; AUSTIN, C.; BAUDAINS, R.; BESONEN, J.; BUCKLEY, K.; BROOK, S.; FALLOWFIELD, G.; GILBY, C.; JONES, R.; LAWTHORP, J.; LLOYD, A.; MACDONOGH, G.; MAYSON, R.; PALIJ, M.; PORT, J.; RADFORD, J.; VOSS, R.; WERNER, G.; WHITE, P.; NICOLAY, P. **Vinhos do mundo todo**. Rio de Janeiro: Zahar, 2006.
- KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, n. 1, p. 43-50, 2000.
- KIRSCHBAUM, B. Total urine antioxidant capacity. **Clinica Chimica Acta**, v. 305, n. 1-2, p. 167-173, 2001.
- KONG, J. M.; CHIA, L. S.; GOH, N. K.; CHIA, T. F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.
- KOO, H. M.; SUHAILA, M. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 3106-3112, 2001.
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.
- LANGCAKE, P.; PRYCE, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 9, p. 77-86, 1976.
- LARSON, R. A.; Autooxidation mechanisms. In: **Naturally Occurring Antioxidants**. New York: Lewis Publishers, 1997. p. 25-49.
- LEE, J.; RENNAKER, C. D. Antioxidant capacity and stilbene contents of wines produced in the Snake River Valley of Idaho. **Food Chemistry**, v. 105, p. 195-203, 2007.
- LEITE, T. T. **Tratamentos pós-colheita em uvas e seus efeitos nos vinhos das variedades Chardonnay e Cabernet Sauvignon**. Santa Maria, 2009. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Ciências Rurais – Universidade Federal de Santa Maria.
- LI, H.; WANG, X.; LI, Y.; LI, P.; WANG, H. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. **Food Chemistry**, v. 112, p. 454-460, 2009(a).
- LI, Y.; BÄCKESJÖ, C. M.; HALDOSÉN, L. A.; LINDGREN, U. Resveratrol inhibits proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 609, n. 1-3, p. 13-18, 2009(b).



- LÓPEZ-VÉLEZ, M.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, F.; VALLE-RIBES, C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 3, p. 233-244, 2003.
- MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim CEPPA**, v. 22, n. 2, p. 233-252, 2004.
- MARASCHIN, M.; PASSOS, R.; SIBILA, P. S.; OLTRAMARI, A. C.; SILVA, J. M. O. D.; DIAS, P. F. ; FONTANA, J. D.; CARO, M. S. B. Isolation and trans-resveratrol analysis in Brazilian red wines by <sup>1</sup>H-Nuclear Magnetic Resonance. In: International Conference on Applications of Magnetic Resonance in Food Science, 5., 2000, Aveiro. **Proceedings...** Aveiro: University of Aveiro – Portugal, 2000. p. 37
- MARASCHIN, R. P.; IANSSEN, C.; ARSEGO, J. L.; CAPEL, L. S.; DIAS, P. F.; ZANUS, C.; CARO, M. S. B.; MARASCHIN, M. Solid-phase extraction and <sup>1</sup>H-NMR analysis of Brazilian Cabernet Sauvignon Wines - A chemical composition correlation study. **Proceedings of the Royal Society of London Series A-Mathematical and Physical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 255-260, 2003.
- MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 163-180.
- MAZZA, G. Anthocyanins in grape and grape products. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 341-371, 1995.
- MAZZA, G.; FUKUMOTO, L; DELAQUIS, P.; GIRARD, B.; EWERT, B. Anthocyanins, phenolics and color of Cabernet Franc, Merlot and Pinot Noir wines from British Columbia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, n. 10, p. 4009-4017, 1999.
- MAZZA, G.; KAY, C. D.; COTTREL, T.; HOLUB, B. J. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.7731-7737, 2002.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C. dos; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.
- MESCHTER, E. L. Effects of carbohydrates and other factors on strawberry products. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 1, p. 579-583, 1954.

- MOLNÁR, V.; BILLES, F.; TYIHÁK, E.; MIKOSCH, H. Theoretical study on the vibrational spectra of methoxy- and formyl-dihydroxy-*trans*-stilbenes and their hydrolytic equilibria. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 69, n. 2, p. 542-558, 2008.
- MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle. **European Food Research and Technology**, v. 220, n. 3-4, p. 331-340, 2005.
- MUKHERJEE, S.; LEKLI, I.; GURUSAMY, N.; BERTELLI, A. A. A.; DAS, D. K. Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 573-578, 2009.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.
- NADERALI, E. K. Obesity and cardiovascular dysfunction: A role for resveratrol? **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 3, p. 45-52, 2009.
- NEPOMUCENO, M. F.; MAMEDE, M. E. O.; MACEDO, D. V.; ARMINDO, A. A.; PEREIRA, L. S.; TABAK, M. Antioxidant effect of dipyrindamole and its derivate RA-25 in mitochondria: correlation of activity and location in the membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1418, p. 285-294, 1999.
- NIEUWOUDT, H. H.; PRETORIUS, I. S.; BAUER, F. F.; NEL, D. G.; PRIOR, B. A. Rapid screening of the fermentation profiles of wines yeasts by Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 248-256, 2006.
- PALSAMY, P.; SUBRAMANIAN, S. Modulatory effects of resveratrol on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin–nicotinamide-induced diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, p. 356-362, 2009.
- PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; ROSAS-ROMERO, A.; SAAVEDRA, G.; MURCIA, M. A.; JIMÉNEZ, A. M.; CODINA, C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. **Life Sciences**, v. 73, p. 1667-1681, 2003.
- PATZ, C. D.; BLIEKE, A.; RISTOW, R.; DIETRICH, H. Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 81-89, 2004.
- PATZ, C. D.; DAVID, A.; THENTE, K.; KURBELM, P.; DIETRICH, H. Viticulture and enology. **Science**, v. 54, p. 80, 1999.

- POZO-BAYÓN, M.; HERNÁNDEZ, M.; MARTÍN-ALVAREZ, P.; POLO, M. Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and White grape varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2089-2095, 2003.
- RAUHA, J. P. REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- RENAUD, S. C.; GUEGUEN, R.; SHENKER, J.; D HOUTAUD, A. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. **Epidemiology**, v. 9, p.184-188, 1998.
- REVILLA, E.; RYAN, J. M.; MARTIN-ORTEGA, G. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grape. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4592-4597, 1998.
- RIVERA, L.; MORÓN, R.; ZARZUELO, A.; GALISTEO, M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, p. 1053- 1063, 2009.
- RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A.; GONZÁLEZ, G.; PÉREZ-TRUJILLO, J. P.; GARCÍA-MONTELONGO, F. J. *Trans*-resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 76, n. 3, p. 371-375, 2002.
- SAIKO, P.; SZAKMARY, A.; JAEGER, W.; SZEKERES, T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? **Mutation Research**, v. 658, n. 1-2, p. 68-94, 2008.
- SALAH, N.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G.; TIJBURG, L.; BOLWELL, G. P.; RICE-EVANS, C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 322, n. 2, p. 339-346, 1995.
- SAUNDERS, L. R.; VERDIN, E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. **Oncogene**, v. 26, p. 5489-5504, 2007.

- SCHINDLER, R.; VONACH, R.; LENDL, B.; KELLNER, R. A rapid automated method for wine analysis based upon sequential injection (SI)-FT-IR spectrometry. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 362, p. 130-136, 1998.
- SEFERIN, M.; SOUTO, A. A.; CARNEIRO, M. C.; SENNA, M. J. H.; CONZ, A.; GOBBI, K. *Trans-resveratrol* concentration in Brazilian Red Wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 4, p. 441-445, 2001.
- SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 2432-2438, 2002.
- SHANKAR, S.; CHEN, Q.; SIDDIQUI, I.; SARVA, K.; SRIVASTAVA, R. K. Sensitization of TRAIL-resistant LNCaP cells by resveratrol (3, 4', 5 tri-hydroxystilbene): molecular mechanisms and therapeutic potential. **Journal of Molecular Signaling**, v. 2, n. 7, p. 1-17, 2007. Disponível em: < <http://www.jmolecularsignaling.com/content/2/1/7> > Acesso em: 18 jun. 2009.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.
- SILVA, B. A.; FERRERES, F.; MALVA, J. O.; DIAS, A. C. P. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 157-167, 2005.
- SIMÃO, A. M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**. São Paulo: Nobel, 1985. 274 p.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- SORIANO, A.; PÉREZ-JUAN, P. M.; VICARIO, A.; GONZÁLEZ, J. M.; PÉREZ-COELHO, M. S. Determination of anthocyanins in red wine using a newly developed method based on Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1295-1303, 2007.
- SOUTO, A. A.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M.; SENNA, M. J. H.; CONZ, A.; GOBBI, K. Determination of *trans-resveratrol* concentrations in Brazilian red wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 4, p. 441-445, 2001.

- SOUTO, A. A.; CONZ, A.; GOBBI, K.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M. Determinação de trans-resveratrol em vinhos gaúchos por HPLC. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 23., 2000, Poços de Caldas. **Anais...** Poços de Caldas: SBQ, 2000.
- SPINELLI, F. R.; VANDERLINDE, R.; DUTRA, S. V.; PEDRUZZI, I.; MARCON, A. R.; BALARDIN, P. B. Teores de resveratrol em vinhos do Rio Grande do Sul. In: Reunião Anual da SBPC, 58., 2006, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBPC, 2006. Disponível em: [http://www.sbpnet.org.br/livro/58ra/JNIC/RESUMOS/resumo\\_3760.html](http://www.sbpnet.org.br/livro/58ra/JNIC/RESUMOS/resumo_3760.html) Acesso em: 21 fev. 2008.
- STASKO, A.; BREZOVA, V.; MAZUR, M.; CERTIK, M.; KALINAK, M.; GESCHEIDT, G. A comparative study on the antioxidant properties of Slovakian and Austrian wines. **Lebensmittel - Wissenschaft und- Technologie**, v. 41, n. 10, p. 2126-2135, 2008.
- STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T. E.; KHOO, J. C.; WITZUM, J. L. Beyond cholesterol. Modification of low density lipoproteins that increase its atherogenicity. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 915-924, 1989.
- TARANTILIS, P. A.; TROIANOU, V. E.; PAPPAS, C. S.; KOTSERIDIS, Y. S.; POLISSIOU, M. G. Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p.192-196, 2008.
- ULRICH, S.; LOITSCH, S. M.; RAU, O.; KNETHEN, V. O.; BRÜNE, B.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; STEIN, J. M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a molecular target of resveratrol-induced modulation of polyamine metabolism. **Cancer Research**, v. 66, p. 7348-7354, 2006.
- URBANO, M.; CASTRO, M. D. L.; PÉREZ, P. M.; GARCÍA-OLMO, J.; GÓMEZ-NIETO, M. A. Ultraviolet-visible spectroscopy and pattern recognition methods for differentiation and classification of wines. **Food Chemistry**, v. 97, p. 166-175, 2006.
- URPI-SARDA, M.; ZAMORA-ROS, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.; CHERUBINI, A.; JAUREGUI, O.; TORRE, R. de la; COVAS, M. I.; ESTRUCH, R.; JAEGER, W.; ANDRES-LACUEVA, C. HPLC–Tandem mass spectrometric method to characterize resveratrol metabolism in humans. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 292-299, 2007.
- VALENTÃO, P.; CARVALHO, M.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; BASTOS, M. L. Protective activity of *Hypericum androsaemum* infusion against *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in isolated rat hepatocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 79-84, 2004.

- VALENTÃO, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; BASTOS, M. L. Antioxidant activity of *Hypericum androsaemum* infusion: scavenging activity against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 10, p. 1320-1323, 2002.
- VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G. R. M. M.; VAN DEN BERG, H.; VANDER V. W.; BAST, A. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. **Food Chemistry**, v. 703, p. 391-395, 2000.
- VAN DER SLUIS, A. A.; DEKKER, M.; JAGER, A. de; JONGEN, W. M. F. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3606-3613, 2001.
- VERSARI, A; PARPINELLO, G. P.; SCAZINNA, F. Prediction of total antioxidant capacity of red wine by Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Control**, v. 21, p 786-789, 2010.
- VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. The antioxidant activity of wines determined by the ABTS(+) method: influence of sample dilution and time. **Talanta**, v. 64, n. 2, p. 501-509, 2004.
- VINHOS. Disponível em:  
<[http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/trabalhos\\_grad/trabalhos\\_grad\\_2006-2/vinhos.htm#\\_Toc157876069](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad/trabalhos_grad_2006-2/vinhos.htm#_Toc157876069)> Acesso em: 06 mar. 2009.
- VINSON, J. A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5315-5321, 2001.
- VONACH, R.; LENDL, B.; KELLNER, R. High-performance liquid chromatography with real-time Fourier-transform infrared detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines. **Journal of Chromatography A**, v. 824, p. 159-167, 1998.
- WOLD, H. Estimation of principal components and related models by iterative least squares. **Multivariate Analysis**, New York: Academic Press, 1966. p. 391-420.
- WROLSTAD, R.E. **Colors and pigment analysis in fruit products**. Corvallis: Oregon Agricultural Experimental Station, 1976. 17 p.

- YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001.
- YU, T. W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, v. 379, n. 2, p. 201-210, 1997.
- ZAFRILLA, P.; MORILLAS, J.; MULERO, J.; CAYUELA, J. M.; MARTÍNEZ-CACHÁ, A.; PARDO, F.; LÓPEZ NICOLÁS, J. M. Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4694-4700, 2003.
- ZHANG, W. J.; BJÖRN, L. O. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. **Fitoterapia**, v. 80, p. 207-218, 2009.
- ZHANG, Y.; LI, S. Z.; LI, J.; PAN, X.; CAHOON, R. E.; JAWORSKI, J. G.; WANG, X.; JEZ, J. M.; CHEN, F.; YU, O. Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and mammalian cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 40, p. 13030-13031, 2006.
- ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.
- ZHOU, J.; CUI, H.; WAN, G.; XU, H.; PANG, Y.; DUAN, C. Direct analysis of *trans*-resveratrol in red wine by high performance liquid chromatography with chemiluminescent detection. **Food Chemistry**, v. 88, n. 4, p. 613-620, 2004.